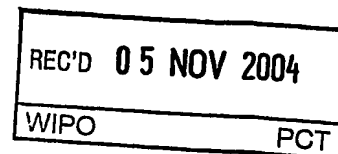


ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ



ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995
Телефон 240 60 15. Телекс 114818 ПДЧ. Факс 243 33 37



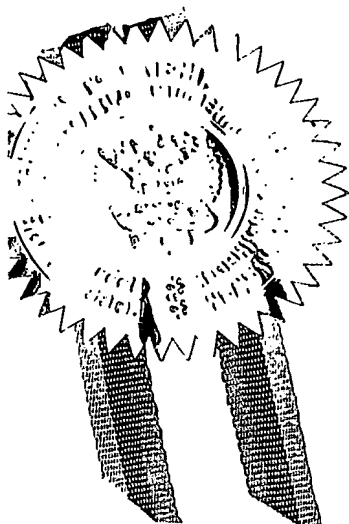
Наш № 20/12-623

«8» октября 2004 г.

СПРАВКА

Федеральный институт промышленной собственности (далее - Институт) настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального заявления, описания, формулы, реферата и чертежей (если имеются) международной заявки № PCT/RU03/00304, поданной в Институт как в Получающее ведомство в соответствии с Договором о патентной кооперации в июле месяце 14 дня 2003 года (14.07.2003).

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Заведующий отделом 20

А.Л.Журавлев

PCT

ЗАЯВЛЕНИЕ

Нижеподписавшийся
просит рассматривать настоящую международную
заявку в соответствии с Договором о патентной
кооперации

Заполняется получающим ведомством

PCT/RU 0 3 / 0 0 3 0 4

Номер международной заявки

14 июля 2003 (14.07.2003)

Дата международной подачи

RO/RU

МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА PCT

PCT INTERNATIONAL APPLICATION
«Международная заявка PCT»№ дела заявителя или агента
(по желанию) (максимум 12 знаков)

Графа I	НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Способ лечения онкологических, инфекционных и соматических заболеваний, методы контроля эффективности лечения, фармацевтические агенты и композиция для осуществления лечения	
Графа II	ЗАЯВИТЕЛЬ <input checked="" type="checkbox"/> Данное лицо является также изобретателем	
Имя и адрес: (Фамилия указывается перед именем, для юридического лица - полное уставное наименование. Адрес должен включать почтовый индекс и название страны. Если государство местожительства пишу не будет указано, то таковым будет считаться страна указанного в данной графе адреса)		Телефон №
Тец Виктор Вениаминович Россия, 196066, Санкт-Петербург, ул. Ленсовета, 27 - 95		Телефакс №
Tets Viktor Veniaminovich RU, 196066, Sankt-Peterburg, ul. Lensoвета, 27 - 95		Телепринтер №
Государство (т.е. страна) гражданства: RU		Регистрационный № заявителя в Ведомстве
Государство (т.е. страна) местожительства: RU		
Данное лицо является заявителем для: <input checked="" type="checkbox"/> всех указанных государств <input type="checkbox"/> всех указанных государств, кроме США <input type="checkbox"/> только США <input type="checkbox"/> государств, указанных в дополнительной графе		
Графа III	ДРУГИЕ ЗАЯВИТЕЛИ И/ИЛИ (ДРУГИЕ) ИЗОБРЕТАТЕЛИ	
Имя и адрес: (Фамилия указывается перед именем, для юридического лица - полное уставное наименование. Адрес должен включать почтовый индекс и название страны. Если государство местожительства пишу не будет указано, то таковым будет считаться страна указанного в данной графе адреса)		Данное лицо является:
Генкин Дмитрий Дмитриевич Россия, 197000, Санкт-Петербург, Константиновский пр., 26 - 2		<input type="checkbox"/> только заявителем:
Genkin Dmitry Dmitrievich RU, 197000, Sankt-Peterburg, Konstantinovskiy pr., 26 - 2		<input checked="" type="checkbox"/> заявителем и изобретателем
		<input type="checkbox"/> только изобретателем (если отмечен этот бокс, то ниже заполнять не требуется)
Государство (т.е. страна) гражданства: RU		Регистрационный № заявителя в Ведомстве
Государство (т.е. страна) местожительства: RU		
Данное лицо является заявителем для: <input checked="" type="checkbox"/> всех указанных государств <input type="checkbox"/> всех указанных государств, кроме США <input type="checkbox"/> только США <input type="checkbox"/> государств, указанных в дополнительной графе		
<input checked="" type="checkbox"/> Другие заявители и/или (другие) изобретатели названы на листе продолжения		
Графа IV	АГЕНТ ИЛИ ОБЩИЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ; ИЛИ АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ	
Указанное ниже лицо настоящим назначается (назначено) представлять интересы заявителя(ей) в компетентных международных органах в качестве: <input type="checkbox"/> агента <input type="checkbox"/> общего представителя		
Имя и адрес: (Фамилия указывается перед именем, для юридического лица - полное уставное наименование. Адрес должен включать почтовый индекс и название страны)		Телефон №
Тец Виктор Вениаминович Россия, 197089, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8, Медицинский университет им. Павлова, кафедра микробиологии		Телефакс №
Tets Viktor Veniaminovich RU, 197089, Sankt-Peterburg, ul. L. Tolstogo, 6/8, Meditsinsky universitet im. Pavlova, kafedra mikrobiologii		Телепринтер №
		Регистрационный № агента в Ведомстве
<input checked="" type="checkbox"/> Адрес для переписки: Пометить этот бокс, если агент или общий представитель не назначаются (не назначены), а указанный выше адрес используется только как специальный адрес для переписки		

188 + 940к.
кв. и.е.

Лист № 2

Графа III ДРУГИЕ ЗАЯВИТЕЛИ И/ИЛИ (ДРУГИЕ) ИЗОБРЕТАТЕЛИ <i>Если ни одна из следующих подграф не используется, этот лист не включается в заявление</i>	
Имя и адрес: <i>(Фамилия указывается перед именем, для юридического лица - полное уставное наименование. Адрес должен включать почтовый индекс и название страны. Если государство местожительства внизу не будет указано, то таковым будет считаться страна указанного в данной графе адреса)</i> Тец Георгий Викторович Россия, 191025, Санкт-Петербург, ул. Пушкинская, 13 - 41 Tets Georgy Viktorovich RU, 191025, Sankt-Peterburg, ul. Pushkinskaya, 13 - 41	Данное лицо является: <input type="checkbox"/> только заявителем: <input checked="" type="checkbox"/> заявителем и изобретателем <input type="checkbox"/> только изобретателем <i>(если отмечен этот бокс, то ниже заполнять не требуется)</i> Регистрационный № заявителя в Ведомстве
Государство (т.е. страна) гражданства: RU	Государство (т.е. страна) местожительства: RU
Данное лицо является заявителем для: <input type="checkbox"/> всех указанных государств <input type="checkbox"/> всех указанных государств, кроме США <input checked="" type="checkbox"/> только США <input type="checkbox"/> государств, указанных в дополнительной графе	
Имя и адрес: <i>(Фамилия указывается перед именем, для юридического лица - полное уставное наименование. Адрес должен включать почтовый индекс и название страны. Если государство местожительства внизу не будет указано, то таковым будет считаться страна указанного в данной графе адреса)</i> 	Данное лицо является: <input type="checkbox"/> только заявителем: <input type="checkbox"/> заявителем и изобретателем <input type="checkbox"/> только изобретателем <i>(если отмечен этот бокс, то ниже заполнять не требуется)</i> Регистрационный № заявителя в Ведомстве
Государство (т.е. страна) гражданства:	Государство (т.е. страна) местожительства:
Данное лицо является заявителем для: <input type="checkbox"/> всех указанных государств <input type="checkbox"/> всех указанных государств, кроме США <input type="checkbox"/> только США <input type="checkbox"/> государств, указанных в дополнительной графе	
Имя и адрес: <i>(Фамилия указывается перед именем, для юридического лица - полное уставное наименование. Адрес должен включать почтовый индекс и название страны. Если государство местожительства внизу не будет указано, то таковым будет считаться страна указанного в данной графе адреса)</i> 	Данное лицо является: <input type="checkbox"/> только заявителем: <input type="checkbox"/> заявителем и изобретателем <input type="checkbox"/> только изобретателем <i>(если отмечен этот бокс, то ниже заполнять не требуется)</i> Регистрационный № заявителя в Ведомстве
Государство (т.е. страна) гражданства:	Государство (т.е. страна) местожительства:
Данное лицо является заявителем для: <input type="checkbox"/> всех указанных государств <input type="checkbox"/> всех указанных государств, кроме США <input type="checkbox"/> только США <input type="checkbox"/> государств, указанных в дополнительной графе	
Имя и адрес: <i>(Фамилия указывается перед именем, для юридического лица - полное уставное наименование. Адрес должен включать почтовый индекс и название страны. Если государство местожительства внизу не будет указано, то таковым будет считаться страна указанного в данной графе адреса)</i> 	Данное лицо является: <input type="checkbox"/> только заявителем: <input type="checkbox"/> заявителем и изобретателем <input type="checkbox"/> только изобретателем <i>(если отмечен этот бокс, то ниже заполнять не требуется)</i> Регистрационный № заявителя в Ведомстве
Государство (т.е. страна) гражданства:	Государство (т.е. страна) местожительства:
Данное лицо является заявителем для: <input type="checkbox"/> всех указанных государств <input type="checkbox"/> всех указанных государств, кроме США <input type="checkbox"/> только США <input type="checkbox"/> государств, указанных в дополнительной графе	
<input type="checkbox"/> Другие заявители и/или (другие) изобретатели названы на другом листе для продолжения	

Графа V УКАЗАНИЕ ГОСУДАРСТВ Пометьте нужные боксы ниже, должен быть отмечен как минимум один бокс

Настоящим делаются следующие указания в соответствии с правилом 4.9(a):

Региональный патент

- ☐ AP Патент ARIPO: GH Гана, GM Гамбия, KE Кения, LS Лесото, MW Малави, MZ Мозамбик, SD Судан, SL Сьерра-Леоне, SZ Свазиленд, TZ Объединенная Республика Танзания, UG Уганда, ZH Замбия, ZW Зимбабве, а также любое другое государство, являющееся Договаривающимся государством Протокола Хараре и PCT (если испрашивается иной вид охраны или статус, написать на пунктирной линии):
- ☒ EA Евразийский патент: AM Армения, AZ Азербайджан, BY Беларусь, KG Кыргызстан, KZ Казахстан, MD Республика Молдова, RU Российская Федерация, TJ Таджикистан, TM Туркменистан, а также любое другое государство, являющееся Договаривающимся государством Евразийской патентной конвенции и PCT
- ☒ EP Европейский патент: AT Австрия, BE Бельгия, CH и LI Швейцария и Лихтенштейн, CY Кипр, DE Германия, DK Дания, ES Испания, FI Финляндия, FR Франция, GB Великобритания, GR Греция, IE Ирландия, IT Италия, LU Люксембург, MC Монако, NL Нидерланды, PT Португалия, SE Швеция, TR Турция, а также любое другое государство, являющееся Договаривающимся государством Европейской патентной конвенции и PCT, SI¹
- ☐ OA Патент ОАРИ: BF Буркина Фасо, BJ Бенин, CF Центральная Африканская республика, CG Конго, CI Кот д'Ивуар, CM Камерун, GA Габон, GN Гвинея, GQ Экваториальная Гвинея, GW Гвинея-Бисау, ML Мали, MR Мавритания, NE Нигер, SN Сенегал, TD Чад, TG Того а также любое другое государство, являющееся членом ОАРИ и Договаривающимся государством PCT (если испрашивается иной вид охраны или статус, написать на пунктирной линии):

Национальный патент (если испрашивается иной вид охраны или статус, написать на пунктирной линии):

- | | | |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> AE Объединенные Арабские Эмираты | <input type="checkbox"/> GM Гамбия..... | <input type="checkbox"/> OM Оман |
| <input type="checkbox"/> AG Антигуа и Барбуда | <input checked="" type="checkbox"/> HR Хорватия | <input type="checkbox"/> NZ Новая Зеландия..... |
| <input type="checkbox"/> AL Албания | <input checked="" type="checkbox"/> HU Венгрия | <input type="checkbox"/> PH Филиппины |
| <input type="checkbox"/> AM Армения | <input type="checkbox"/> ID Индонезия | <input type="checkbox"/> PL Польша |
| <input type="checkbox"/> AT Австрия | <input checked="" type="checkbox"/> IL Израиль | <input type="checkbox"/> PT Португалия |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Австралия | <input checked="" type="checkbox"/> IN Индия | <input type="checkbox"/> RO Румыния |
| <input type="checkbox"/> AZ Азербайджан | <input checked="" type="checkbox"/> IS Исландия | <input checked="" type="checkbox"/> RU Российская Федерация |
| <input type="checkbox"/> BA Босния и Герцеговина..... | <input checked="" type="checkbox"/> JP Япония | <input type="checkbox"/> SD Судан |
| <input type="checkbox"/> BB Барбадос | <input type="checkbox"/> KE Кения | <input type="checkbox"/> SE Швеция |
| <input type="checkbox"/> BG Болгария | <input type="checkbox"/> KG Кыргызстан | <input type="checkbox"/> SG Сингапур |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Бразилия..... | <input type="checkbox"/> KP Корейская народно-демократическая республика | <input checked="" type="checkbox"/> SI Словения..... |
| <input type="checkbox"/> BY Беларусь | <input checked="" type="checkbox"/> KR Республика Корея | <input type="checkbox"/> SK Словакия |
| <input type="checkbox"/> BZ Белиз | <input type="checkbox"/> KZ Казахстан | <input type="checkbox"/> SL Сьерра-Леоне |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Канада | <input type="checkbox"/> LC Сент-Люсия | <input type="checkbox"/> TJ Таджикистан |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Швейцария и Лихтенштейн | <input type="checkbox"/> LK Шри Ланка | <input type="checkbox"/> TM Туркменистан |
| <input type="checkbox"/> CN Китай..... | <input type="checkbox"/> LR Либерия | <input type="checkbox"/> TN Тунис |
| <input type="checkbox"/> CO Колумбия | <input type="checkbox"/> LS Лесото | <input type="checkbox"/> TR Турция |
| <input type="checkbox"/> CR Коста Рика | <input type="checkbox"/> LT Литва | <input type="checkbox"/> TT Тринидад и Тобаго |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Куба..... | <input type="checkbox"/> LU Люксембург | <input type="checkbox"/> TZ Танзания |
| <input type="checkbox"/> CZ Чешская республика | <input type="checkbox"/> LV Латвия | <input type="checkbox"/> UA Украина..... |
| <input type="checkbox"/> DE Германия | <input type="checkbox"/> MA Марокко | <input type="checkbox"/> UG Уганда |
| <input type="checkbox"/> DK Дания | <input type="checkbox"/> MD Республика Молдова | <input checked="" type="checkbox"/> US Соединенные Штаты Америки .. |
| <input type="checkbox"/> DM Доминика | <input type="checkbox"/> MG Мадагаскар | <input type="checkbox"/> UZ Узбекистан..... |
| <input type="checkbox"/> DZ Алжир..... | <input type="checkbox"/> MK Бывшая Югославская республика Македония..... | <input type="checkbox"/> VN Вьетнам..... |
| <input type="checkbox"/> EC Эквадор | <input type="checkbox"/> MN Монголия | <input checked="" type="checkbox"/> YU Югославия..... |
| <input type="checkbox"/> EE Эстония | <input type="checkbox"/> MW Малави | <input type="checkbox"/> ZA Южная Африка..... |
| <input type="checkbox"/> ES Испания | <input type="checkbox"/> MX Мексика | <input type="checkbox"/> ZH Замбия |
| <input type="checkbox"/> FI Финляндия | <input type="checkbox"/> MZ Мозамбик | <input type="checkbox"/> ZW Зимбабве..... |
| <input type="checkbox"/> GB Великобритания | <input type="checkbox"/> NO Норвегия | |
| <input type="checkbox"/> GD Гренада | | |
| <input type="checkbox"/> GE Грузия | | |
| <input type="checkbox"/> GH Гана | | |

Боксы, зарезервированные для указания государств, которые стали участниками PCT после выпуска данного листа

- | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Упоминание о предварительных указаниях: В дополнение к указаниям, сделанным выше, заявитель, в соответствии с правилом 4.9(b), делает также все указания, допустимые в соответствии с PCT, за исключением указания (указаний), приведенного в Дополнительной графе в качестве исключенных из данного упоминания, и заявляет, что эти дополнительные указания подлежат подтверждению, и что любое указание, не подтвержденное до истечения 15 месяцев с даты приоритета, должно считаться изъятым заявителем на момент истечения этого срока. (Подтверждение (включая оплату пошлины) должно быть представлено в получающее ведомство в пределах 15-месячного срока)

Графа VI ЗАЯВЛЕНИЕ НА ПРИОРИТЕТ				
Настоящим заявляется приоритет следующей предшествующей заявки(ок) :				
Дата подачи предшествующей заявки (день/месяц/год)	Номер предшествующей заявки	Если предшествующая заявка является:		
		национальной заявкой: страна	региональной заявкой: региональное ведомство	международной заявкой: получающее ведомство
(1)				
(2)				
(3)				
(4)				
(5)				

☐ Последующие заявления на приоритет указаны в Дополнительной графе

Получающему ведомству поручается подготовить и направить в Международное бюро заверенную копию предшествующей заявки(заявок)(только в том случае, если предшествующая заявка(заявки) была подана в ведомство, которое для настоящей международной заявки является получающим ведомством), указанную выше как:

☐ все ☐ (1) ☐ (2) ☐ (3) ☐ (4) ☐ (5) ☐ другое, см. Дополнительную графу

*Если предшествующей заявкой является заявка ARIPO, то должна быть указана, по крайней мере, одна страна-участница Парижской конвенции по охране промышленной собственности или одна страна-член Всемирной Торговой Организации, в которую была подана ранняя заявка (правило 4.10(b)(ii)).....

Графа VII МЕЖДУНАРОДНЫЙ ПОИСКОВЫЙ ОРГАН	
Выбор международного поискового органа (ISA) (если компетентными в проведении международного поиска являются два или более международных поисковых органа, указать выбранный поисковый орган; можно использовать дефисный код):	
ISA / <u>RU</u>	
Просьба об использовании результатов ранее проведенного поиска; ссылка на такой поиск (если поиск был уже проведен или запрошен у Международного поискового органа ранее):	
Дата (день/месяц/год)	Номер Страна (или региональное ведомство)

Графа VIII ДЕКЛАРАЦИИ	
Данное заявление содержит следующие декларации (ниже отметить необходимые боксы и указать в правой колонке количество каждого типа деклараций):	Количество деклараций
<input type="checkbox"/> Графа VIII (i) Декларация об удостоверении личности изобретателя	:
<input type="checkbox"/> Графа VIII (ii) Декларация о правомочности заявителя на дату международной подачи подавать заявку и получать патент	:
<input type="checkbox"/> Графа VIII (iii) Декларация о правомочности заявителя на дату международной подачи на заявление о приоритете в случае, если он не является заявителем, подавшим предшествующую заявку	:
<input type="checkbox"/> Графа VIII (iv) Декларация об авторстве на изобретение для целей указания Соединенных Штатов Америки	:
<input type="checkbox"/> Графа VIII (v) Декларация о не наносящих ущерб раскрытиях или изъятиях из-за отсутствия новизны	:

Графа IX КОНТРОЛЬНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ; ЯЗЫК ПОДАЧИ

Настоящая международная заявка содержит:

(a) следующее количество листов на бумажном носителе:

заявление (включая декларацию) : 5
 описание (исключая перечень последовательностей) : 61
 формула : 4
 реферат : 1
 чертежи : 1

Предварительное число листов : 72

часть описания с перечнем последовательностей (действительное число листов, представленных на бумажном носителе, независимо от представления в машиночитаемой форме; см. ниже пункт (b)) : 24

Общее число листов : 96

(b) перечень последовательностей представлен в машиночитаемой форме

(i) ☐ только (в соответствии с разделом 801(a)(i))(ii) ☒ как приложение к представленному на бумажном носителе (в соответствии с разделом 801(a)(ii))

Тип и количество носителей (дискета, CD-ROM, CD-R или другое), на котором представлен перечень последовательностей (дополнительно к указанному в пункте 9(ii) в правой колонке): Дискета - 1

К настоящей международной заявке приложены следующие документы (ниже следует отметить соответствующие боксы и указать с права количество приложений каждого вида):

1. ☐ лист расчета пошлин :
 2. ☐ оригинал отдельной доверенности :
 3. ☐ оригинал генеральной доверенности :
 4. ☐ копия генеральной доверенности; ссылка на номер, если имеется: :
 5. ☐ разъяснения по поводу отсутствия подписи :
 6. ☐ приоритетный(ые) документ(ы), указанный в графе VI под № :
 7. ☐ перевод международной заявки на (язык): :
 8. ☐ информация о депонировании микроорганизмов или другого биологического материала :
 9. ☐ перечень последовательностей в машиночитаемой форме (указать тип и число носителей (дискета, CD-ROM, CD-R или иное)) :
 (i) ☐ копия, представленная для целей международного поиска в соответствии с правилом 13 ter (и не являющаяся частью международной заявки) :
 (ii) ☐ (только в случае, если слева отмечены боксы (b)(i) или (b)(ii)) дополнительно представленная копия, если допустимо, копия для целей международного поиска в соответствии с правилом 13 ter :
 (iii) ☐ вместе с соответствующим представлением перечня последовательностей, как его заявление отмечено слева :
 10. ☐ иное (указать) :

Кол-во приложений

Фигура чертежей, предлагаемая для публикации с рефератом:

Язык подачи международной заявки:

Графа X ПОДПИСЬ ЗАЯВИТЕЛЯ, АГЕНТА ИЛИ ОБЩЕГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ

Рядом с каждой подписью указать фамилию каждого подписавшего и указать, в каком качестве он подписал заявление (если это не очевидно из данных, приведенных в заявлении).

Тсц В. В.

Генкин Д. Д.

Тсц Г. В.

Заполняется получающим ведомством		2. Чертежи: <input checked="" type="checkbox"/> получены: <input type="checkbox"/> не получены:
1. Дата фактического получения международной заявки: 14 ИЮЛЯ 2003 (14.07.2003)	3. Исправленная дата при более позднем, но своевременном получении страниц или чертежей, доукомплектовывающих предполагаемую международную заявку:	
4. Дата своевременного получения требуемых исправлений согласно статье 11(2) PCT:	6. <input type="checkbox"/> Направление копии для поиска задержано впредь до уплаты пошлины за поиск	
5. Международный поисковый орган (если компетентны два и более): ISA/ RU		

Заполняется Международным бюро
Дата получения регистрационного экземпляра
Международным бюро:

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ, ИНФЕКЦИОННЫХ И
СОМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ И
5 КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ЛЕЧЕНИЯ

Область техники

Изобретение относится к медицине и ветеринарии и раскрывает
новый способ лечения онкологических, инфекционных и
неинфекционных заболеваний, при котором главной мишенью
10 терапевтического воздействия является свободно циркулирующая в
плазме крови (и других жидких средах) больного ДНК, происходящая из
находящихся в его организме опухолевых, мутантных, или
инфицированных бактериями, грибами, простейшими клеток, а также из
различных микроорганизмов. Описаны новые фармацевтические
15 композиции и методы их применения для лечения онкологических
заболеваний, инфекционных состояний, вызванных бактериями, грибами
и простейшими, а так же неинфекционных соматических заболеваний и
состояний, связанных с накоплением соматических в клетках организма.
Изобретение описывает лекарственные и иммунологические
20 композиции, а также сорбционные и физико-химические технологии и
способы их применения для лечения злокачественных опухолей и
профилактики их рецидива, а так же лечения инфекций, атеросклероза,
диабета и для замедления процесса старения. Предложенный способ
отличается новым принципом действия, повышенной эффективностью
25 противоопухолевого и противомикробного воздействия и может найти
применение в терапии онкологических заболеваний, различных
инфекций и неинфекционных соматических заболеваний.

Предшествующий уровень техники

Популяции опухолевых клеток, развивающиеся в организме больного,
30 обладают чрезвычайно высокой степенью генетической

изменчивости, намного превышающей таковую у здоровых клеток. Генетическая изменчивость популяций опухолевых клеток позволяет им в процессе заболевания генерировать фенотипы, нечувствительные к иммунному и морфогенетическому контролю, способные к инвазии и метастазированию и нечувствительные к противоопухолевой терапии. Считается, что селекционный отбор и клональная экспансия опухолевых клеток лежат в основе биологической и клинической "прогрессии" опухолей. В соответствии с этими представлениями, стратегия современной противоопухолевой терапии основана на принципе уничтожения клонов опухолевых клеток в организме больного с помощью методов – химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, хирургического удаления и различных их комбинаций. Все эти методы имеют одну общую фундаментальную особенность – конечной терапевтической мишенью воздействия является опухолевая клетка. Опыт подобной терапии свидетельствует, что вследствие высокой генетической изменчивости опухолевые клетки в основном приобретают нечувствительность к применяемой терапии до того, как используемая методика позволяет их полностью уничтожить.

Существует значительная потребность в новых противоопухолевых лекарствах, менее токсичных, чем большинство из ныне известных. Также имеется потребность в новых противоопухолевых препаратах, которые могут быть использованы для повышения эффективности ныне известных методов. Аналогично, существует значительная потребность в новых противоопухолевых лекарствах, которые могут быть использованы для снижения токсичности ныне известных методов лечения без уменьшения их эффективности.

Циркуляция молекул ДНК в плазме крови больных онкологическими заболеваниями и здоровых людей описана в ряде работ (P.Anker et al. , Clinica Chimica Acta ,v.313, 2001, pp143-146; Fedorov N.A.

et.al., Bull.Exp.Biol.Med.,v102,1986, pp281-283). Патент (US 5952170) описывает определение ДНК в плазме крови для диагностики и прогнозирования течения онкологических заболеваний Патенты (US 6465177 и US 6156504) описывают использование ДНК плазмы крови
5 для определения мутаций в онкогенах и микросателлитных участках генов, изучения геномной нестабильности в опухолях и использования результатов наблюдений для диагностики, мониторингирования и прогнозирования течения заболевания.

Sugihara S . et al.(1990, 1993) изучали влияние ферментов альфа
10 химотрипсина и дезоксирибонуклеазы I (ДНКазы I) на аутологичную и гетерологичную адгезию опухолевых клеток при метастазировании. Ими показано, что системное введение ДНКазы I приводит к замедлению роста метастазов. Однако выявленный эффект оказался недостаточным. Авторы делают вывод, что ДНКазы I может быть использована вместе с
15 хирургическим удалением опухоли для предотвращения гематогенного метастазирования. Идея авторов заключалась в воздействии на цитоплазматическую мембрану опухолевых клеток и не включала разрушения свободно циркулирующей ДНК. Используемые режим и дозы не могли вызвать продолжительного снижения уровня
20 циркулирующей ДНК.

Torchilin V.P. (2001), Патент US 5,780,033, заявляет использование аутоантител, способных связываться с
цитоплазматическими и ядерными мембранами опухолевых клеток, и с протеин-ДНК комплексом, происходящим из мертвых опухолевых
25 клеток. Из текста заявки видно, что речь идет именно об антителах против белковых антигенных детерминант. В нашем случае используются анти-ДНК антитела и анти-ДНК абзимы. Кроме того, заявленная авторами терапия направлена против фагоцитоза нуклеосом на поверхности опухолевых клеток, что исключает формирование

адекватных терапевтических режимов, необходимых для связывания и выведения из циркуляции ДНК, находящейся в плазме.

Практически нет данных о циркуляции в крови бактериальной ДНК. В организме человека все микробы существуют в составе сообществ-биопленок (Davey M.E. O'toole G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to Molecular genetics. Microbiol. Mol.Genet. 64:847-867). Биопленки образованы микробными клетками, объединенными с помощью внеклеточного матрикса (Tetz V.V. 1999. Formation and structure of mixed bacterial communities. APMIS, 107:645-654). В составе матрикса биопленок нами обнаружена внеклеточная ДНК, попадающая туда из живых клеток. Наши данные свидетельствуют также, что бактериальная ДНК присутствует в плазме крови инфицированного человека, а её количество и состав могут изменяться при развитии определенных инфекций. Известно, что ДНК может попадать в окружающую среду также при гибели клеток, например в очаге воспаления. При этом, будучи полимером, ДНК значительно повышает вязкость материала (секрета), что негативно сказывается на течении заболевания, затрудняет удаление патогенов, токсинов, разрушенных клеток и.т.д. Известен лечебный препарат (Gentech –Roch) "Pulmosime", представляющий собой альфа-ДНК-азу, которая вводится ингаляционно, при лечении муковисцидоза. Эффект действия связан с местным разжижением секрета и не имеет отношения к нарушению транспорта генетической информации этими молекулами ДНК.

Систематический анализ спектра ДНК из крови людей и животных отсутствует. Данные исследований ДНК плазмы крови без проведения ПЦР в печати не обнаружены. Использование ПЦР может сильно исказить состав ДНК плазмы в силу специфичности праймеров, применяемых для амплификации. В связи с этим до последнего времени генетический анализ ДНК плазмы, проводился в основном при помощи

ПЦР или блот-гибридизации, и был направлен на изучение изменений в определённых участках генома (например в микростателлитах и отдельных генах) при опухолевом процессе (Sanchez-Cespedes M., et al., Ann Oncol, 1998, v9(1), pp113-116; Sozzi G., et al., Clin Can Res, 1999, v5(10), pp2689-2692; Chen X.Q., et al., Nat Med, 1996, v2(9), pp1033-1035).

Таким образом, отсутствуют знания о генетическом репертуаре ДНК, циркулирующей в плазме крови больных при онкопатологии, инфекциях, соматической патологии и у здоровых людей, ее биологической роли и возможном терапевтическом эффекте ее уничтожения или инактивации для лечения этих заболеваний.

Раскрытие изобретения

В результате работы над изобретением неожиданно было обнаружено, что ДНК, свободно циркулирующая в плазме крови онкологических больных, содержит уникальный по своему качественному и количественному составу репертуар генов и регуляторных генетических элементов, резко отличающийся от репертуара ДНК, описанного в геноме человека. ДНК плазмы крови онкологических больных содержит в основном уникальные гены человека, включая гены, ассоциированные с поддержанием и формированием «злокачественного» фенотипа. Показано, что ДНК плазмы крови онкологических больных участвует в межклеточном переносе генетической информации внутри популяции опухолевых клеток в организме больного. Настоящее изобретение раскрывает методы уничтожения или инактивации свободно циркулирующей в плазме ДНК, что приводит к подавлению развития раковой опухоли в организме. Изобретение так же включает в себя метод идентификации новых геномных последовательностей, вовлеченных в прогрессию опухолей и в функционирование генома человека. Этот аспект изобретения связан с

выделением, клонированием и секвенированием образцов ДНК из плазмы крови онкологических больных и здоровых людей.

Обнаружено, что различные бактерии выделяют ДНК в матрикс биопленок, и она попадает в кровь и тканевую жидкость в организме человека и животных. Установлено, что наличие внеклеточной ДНК является одним из условий развития микробной инфекции.

Изобретение включает в себя уничтожение и(или) инактивацию циркулирующей микробной ДНК как метода лечения и профилактики, вызываемых ими заболеваний.

10 Также было обнаружено, что ДНК циркулирующая в крови здоровых людей играет существенную роль в развитии соматического мозаицизма, а ее связывание, разрушение или инактивация подавляют развитие соматического мозаицизма. Связывание, разрушение или инактивация ДНК, циркулирующей в плазме крови дает леченый эффект при
15 заболеваниях, связанных с развитием соматического мозаицизма

Один аспект изобретения раскрывает фармацевтические композиции и нефармацевтические методы уничтожения или инактивации свободно циркулирующей ДНК в плазме крови больных при онкопатологии и инфекциях.

20 Другой аспект изобретения раскрывает способ лечения больных при онкопатологии, инфекциях, соматических заболеваниях и для продления жизни, связанный с введением им фармацевтических композиций или применением нефармацевтических методов, приводящих к уничтожению или инактивации свободно циркулирующей
25 в плазме ДНК.

Еще один аспект изобретения раскрывает способ контроля эффективности лечения, направленного на уничтожение или инактивацию свободно циркулирующей в плазме ДНК, включающий мониторинг содержания ДНК в плазме крови и определение

наличия в ней опухолеспецифических или микробных генетических маркеров.

Описаны также способы лечения больных при онкопатологии и инфекциях, связанные с введением им фармацевтических композиций
5 или применением нефармацевтических методов, приводящих к уничтожению или инактивации свободно циркулирующей в плазме ДНК, когда подобное лечение сочетается с применением стандартных методов противоопухолевой или противомикробной терапии.

Генетическая изменчивость раковых клеток, позволяющая
10 популяции раковых клеток быстро накапливать и поддерживать признаки, формирующие злокачественный «фенотип», проявляется на геном и хромосомном уровнях потерей, приобретением или изменением последовательностей ДНК – от единичных нуклеотидов до целых хромосом. (Loeb K.R. et.al., Carcinogenesis, v21,2000,pp.379-385).
15 Источником подобной изменчивости считается особый *modus operandi* генетического аппарата раковой клетки - значительно повышенная частота спонтанной мутационной изменчивости на фоне сниженной активности репарационных механизмов и отключения систем контроля генетического гомеостаза (Schmutte C., et al., Anticancer Res., 1999, v19, pp.4665-4696).
20 Считается, что «мутаторный» фенотип раковых клеток (Loeb L.A., Cancer Research, 2001, v61, pp.3230-3239), свойственная клонам раковых клеток динамическая гетерогенность (Heppner G.H. et al., International Review of Cytology, 1998, v177, pp.1-56) и многочисленные повторяющиеся раунды селекции раковых клонов в процессе прогрессии
25 опухоли (Cahill D.P. et al., Trends in Cell Biology, v9, pp.M57-M60 ; Rubin H., Adv Cancer Res, 2001, v83, pp.159-207; P. Nowell, Seminars in Cancer Biology, v 12, 2002, pp.261-266) приводят в конечном итоге к селекции и последующей экспансии наиболее злокачественного ракового клона. В соответствии с этими имеющимися знаниями современные методы

лечения злокачественных новообразований построены на принципе уничтожения опухолевых клеток в организме больного.

В процессе исследований было неожиданно обнаружено, что накопление генетических изменений, необходимых для формирования «злокачественного фенотипа» клинически продвинутой раковой опухоли является следствием кооперативного межклонального взаимодействия внутри популяции раковых клеток в организме больного, связанного с горизонтальным переносом генетической информации.

Мессенджером подобного кооперативного взаимодействия является свободно циркулирующая в плазме крови опухолевых больных ДНК, осуществляющая внутрипопуляционный межклональный перенос генов, участвующих в формировании «злокачественного фенотипа» популяции.

Разрушение или инактивация свободно циркулирующей в плазме ДНК приведет к тому, что популяция опухолевых клеток в организме не может поддерживать необходимый уровень генетической изменчивости и теряет способность поддерживать «злокачественный фенотип» (рост, метастазирование, нечувствительность к терапии). Подобное вмешательство имеет как самостоятельную терапевтическую ценность, так и повышает эффективность традиционных методов терапии.

Краткий перечень иллюстраций

Фиг.1 Результаты иммуногистохимического окрашивания гистологических срезов опухоли мышей получавших 5 дневный курс терапии Доксорубицином (2мг/кг ежедневно внутривенно) и I (0,5 мг/кг; четыре раза в день на протяжении 5 дней).

А - доксорубицин + ДНКаза

В - доксирубицин

Лучший вариант осуществления изобретения.

Выделение свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови.

Свежую (не более 3-4 часов после забора) плазму крови с добавленным антикоагулянтом (цитрат натрия) откручивали на подушке из Ficoll-PlaquePlus(Amersham-Pharmacia) при 1500g 20 минут при комнатной температуре. Плазму (1/2 от всего количества) аккуратно отбирали, не задевая остаток клеток на подушке фиколла и откручивали при 10 000 g 30 минут чтобы избавиться от обломков клеток и дебриса. Супернатант отбирали, не затрагивая осадок, добавляли до 1% саркозила, до 50мМ трис-HCl, pH 7,6, до 20 мМ ЭДТА, до 400 мМ NaCl, и равный объем смеси фенол-хлороформ 1:1. Полученную эмульсию инкубировали при 65°C 2 часа, затем отделяли фенол-хлороформ центрифугированием при 5000g в течении 20 минут при комнатной температуре. Процедуру депротеинизации фенол-хлороформом повторяли идентичным способом трижды, после чего водную фазу обрабатывали хлороформом, затем диэтиловым эфиром. Отделение от органических растворителей производили центрифугированием при 5000g в течении 15 минут. К полученной водной фазе добавляли равный объем изопропанола и инкубировали в течение ночи при 0°C. После осаждения нуклеиновые кислоты отделяли центрифугированием при 0°C, 10000g в течении 30 минут. Осадок нуклеиновых кислот растворяли в буфере, содержащем 10мМ трис-HCl , pH 7,6, 5 мМ ЭДТА, и наносили на подушку из ступенчатого хлористого цезия (1M, 2.5M, 5.7M) в центрифужной пробирке для ротора SW60Ti. Объем ДНК составлял 2 мл, объем каждой ступеньки CsCl — по 1 мл. Ультрацентрифугирование проводили в приборе L80-80 (Beckman) 3 часа при 250000 g. ДНК отбирали с поверхности ступеньки 5.7M по фракциям. Фракции диализировали 12 часов. Будет добавлено мМ трис-HCl, pH 7,6, 1мМ ЭДТА при 4°C. Наличие ДНК во фракциях определяли агарозным электрофорезом, с визуализацией ДНК бромистым этидием. Количество ДНК определяли спектрофотометрически (Beckman DU70) в кювете объемом 100мкл,

снимая спектр от 220 до 320 нм. Средний выход ДНК в расчете на 1 мл плазмы составлял 10-20 нг.

Клонирование и секвенирование ДНК плазмы крови

Нами был разработан новый метод выделения и клонирования ДНК из плазмы крови, позволяющий конструировать неамплифицированные плазмидные библиотеки такой ДНК с представительностью до миллиона клонов со средним размером в 300-500 пар оснований из 50 мл крови даже с учётом существенного присутствия в плазме различных больных повышенного уровня липополисахаридов и неидентифицированных примесей, существенно затрудняющих очистку нуклеиновых кислот. Таким образом, репрезентативный анализ можно проводить и с меньшими количествами образца плазмы – 10-20 мл в зависимости от присутствия патологических контаминантов. Выделенная по ранее описанному протоколу ДНК была подвергнута дополнительной тщательной депротеинизации с применением протеиназы К (Sigma) при 65°C для удаления прочно связанных белков. После депротеинизации и однократной обработки фенол-хлороформом при 65°C, ДНК осаждали 2,5 объемами этанола в течение ночи. Затем ДНК либо обрабатывали рестриктазой EcoRI в течение 3 часов, либо Pfu полимеразой (Stratagene) в присутствии 300 мкМ всех дезоксинуклеотидтрифосфатов для удаления «липких» концов. Достроенную ДНК фосфорилировали полинуклеотидкиназой T4 (30U, 2 ч.). Полученные препараты лигировали в плазмиду pBluescript (Stratagene), переваренную EcoRI или PvuII соответственно, и десфосфорилированную щелочной фосфатазой CIP (Fermentas) в течение 1 часа. Для лигирования обычно использовали 1 мкг вектора и 0,1-0,5 мкг сывороточной ДНК. Лигирование проводили при помощи Rapid Ligation Kit (Roche) 10 часов при 16°C. Объем лигазной смеси составлял 50 мкл. Лигированную библиотеку трансформировали в клетки DH12S

(Life Technologies) с применением электропоратора (BioRad). Для трансформации одной библиотеки. использовали 12-20 электропорационных кювет. Для контроля на чашки с 1,5% агаром и средой LB, содержащей 100мкг/мл ампициллина высевали разведения библиотеки 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} . В обоих случаях представительность библиотеки составляла примерно $2-3 \times 10^6$ клонов. Теоретически, набор последовательностей ДНК, циркулирующих в плазме, должен соответствовать набору последовательностей ДНК генома. Апоптоз клеток в норме сопровождается практически количественной и неспецифической деградацией ДНК до её выхода из клетки, поэтому в плазме должны быть представлены наиболее часто встречающаяся ДНК – повторяющиеся элементы генома в пропорции соответствующей неспецифической деградации ДНК. К таким элементам относятся L1 повторы, сателлитная ДНК, повторы Alu, MER, MIR, THE, и некоторые другие. Количество уникальных последовательностей должно быть невелико, в соответствии с их малым процентом в геноме человека и может не детектироваться без ПЦР в клонированной ДНК.

Библиотека ДНК плазмы крови больного раком в клинически продвинутой стадии.

Мы сконструировали библиотеку ДНК плазмы крови пациента с диагностированной мезотелиомой в поздней стадии. Представительность библиотеки составила около 8.5×10^5 клонов, что вполне удовлетворительно, учитывая весьма небольшое (около $5 \mu\text{g}$) количество ДНК, полученной после очистки от нехарактерных для здорового донора липополисахаридов, присутствовавших в плазме в сверхвысокой концентрации. Анализ 96 клонов длиной от 300 до 1000 пар оснований дал в высшей степени неожиданный результат. (Здесь следует отметить, что только один из проанализированных клонов не был идентифицирован, как человеческая ДНК, для остальных из

HumanGenBank была получена соответствующая информация, идентифицирующая ДНК этих клонов, (как ДНК человека). Как указывалось выше, из имеющихся в литературе данных, логично было бы предположить значительную представленность в образцах ДНК

5 высокоповторяющихся элементов. Однако, по меньшей мере 55 из 96 клонов представляют уникальные последовательности ДНК человека. Учитывая реальное соотношение повторяющихся и уникальных элементов генома человека (примерно 95% к 5%) этот результат свидетельствует о том, что репертуар ДНК плазмы данного пациента

10 крайне отличен от состава ДНК в геноме. В данном случае наблюдается резкое обогащение препарата уникальными фрагментами ДНК.

Из 55 фрагментов уникальной ДНК, идентифицированных при секвенировании 96 клонов из библиотеки ДНК плазмы больного функция или продукт соответствующего гена были идентифицированы

15 для 15 последовательностей. Таблицы 1- 15 приводят перечень этих последовательностей и информацию об их участии в формировании и поддержании злокачественного фенотипа.

Таблица 1

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 24	Семейство рецепторных белков, связанных с G белком .	Ключевая роль в регуляции жизнедеятельности раковых клеток. Функционирование связано с клеточной трансформацией, подавлением апоптоза, нечувствительностью к гормонам и метастазированием	Steeg P.S. ,Nat Rew Cancer,2003,v.3, pp.55-63. Raj G.V. ,J Urology, 2002,v.167, pp.1458-1463. Hoff A.O., Neoplasia,1999 v.1, pp.485-491.

Таблица 2

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 43	Snf2-связанный CBP активатор (SCRAP)	Транскрипционный активатор. Гомологи связаны с развитием синовиальной саркомы и лейкемии.	Thaete C., Hum Mol Genet, 1999, v.8, pp.5 85-91. Monroy M.A., J Biol Chem, 2001, v.276, pp.40721-40726 Lee D.W., Cancer Res., 2000, v.60, pp.3612-3622.

Таблица 3

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 51	SRY-box содержащий ген	Транскрипционный модулятор . Экспрессируется в эмбриогенезе. Гомологи связаны с медуллобластомами, опухолями гонад, высокометастатическо й меланомой.	Graham J.D., J Mol endocrinol, 1999, v.22, pp.295- 304. Lee C.J., J Neurooncol, 2002, v.57, pp.201- 214. Uehara S., Cancer Genet Cytogenet, 1999, v.11 3., pp.78-84. Tani M., Genomics, 1997, v.39, pp.30-37

Таблица 4

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 72	Тирозин-киназа	Гомологи играют ключевую роль в клеточной регуляцией при раке. Ряд тирозинкиназ является продуктом клеточных онкогенов.	Hunter T. , Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1998,v.353.,pp.583- 605. Scheijen B.,Oncogene, 2002,v.21.,pp.3314- 3333.

Таблица 5

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 83	Fibroblast activation protein alpha; сериновая протеаза, связанная поверхностной мембраной.	Гомологи играют важную роль в инвазии и метастазировании раковых клеток. FAP активен в строме раковых опухолей и присутствует в карциномах различного происхождения.	Chen W.T, Enzyme Protein,1996,v.49.,p p.59-71. Scanlan M.J.,Proc Nat Acad Sci USA, 1994, v.91,pp.5657- 5661. Mathew S., Genomics, 1995,v.25,pp.335- 337.

Таблица 6

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 86	Brain testican	Протеогликан с неизвестной функцией. Связан со злокачественным фенотипом эмбриональной рабдомиосаркомы.	Genini M., Int J Cancer, 1996, v.66, pp.571- 577.

Таблица 7

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 152	KRAB domain, Zn-finger proteins	Гомологи известны как транскрипционные репрессоры. Экспрессия наблюдается в раннем эмбриогенезе, в клетках нейробластомы, Ewing саркоме, Т-клеточной лимфоме, в процессе прогрессии и приобретении лекарственной устойчивости при раке легкого.	Oguri T., Gene, 1998, v.222, pp.61-67 Gou D.M., Biochim Biophys Acta, 2001, v.1518, pp.306-310 Margolin J.F., Proc Nat Acad Sci USA, 1994, v/91, pp.4509-4513. Bellefroid E.J., EMBO J, 1993, v.12, pp.1363- 1374. Gonzales-Lamuno D., Pediatr Pathol Mol Med, 2002, v.21, pp.531- 540. Marilee J.W., Gene, 1994, v.152, pp.227- 232.

Таблица 8 .

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 190	Антиген, связанный с меланомой	Антиген, узнаваемый аутологичными инфильтрирующими опухоль лимфоцитами	J.Immunol.166(4),2871 -2877,2001

Таблица 9

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 167	N-cadherin	Участвует в процессах клеточной адгезии. Играет важную роль в процессах роста инвазии и метастазирования раковых клеток.	Hazan R.B.,J Cell Biol, 2000,v.148,pp.779-790. Li G.,Cancer Res, 2001,v.61,pp.3819- 3825. Tran N.L.,J Biol Chem, 2002,v.277,pp.32905- 32914.

Таблица 10

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 197	FAF1: Fas associated factor 1	Фосфопротеин известный как проапоптотический фактор.	Jensen H.H.,Int J Biochem Cell Biol, 2001,v.33,pp.577-589. Ryu S.W.,Biochem Biophys Res Commun, 2001,v.286,pp.1027- 1032.

Таблица 11.

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 114	Интерлейкин-7	Цитокин. Предполагается, что он является необходимым паракринным-аутокринным фактором роста для многих типов рака..	Trinder P., Int J Oncol, 1999,v.14,pp.23-31. Cosenza L., Cell Signalling, 2002,v.14,pp.317-325.

Таблица 12

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 208	DEAD Box RNA helicase – like protein	Гомологи связаны с метаболизмом РНК. Экспрессируются в пролиферирующих раковых клетках.	Iggo R.D., Mol Cell Biol, 1991,v.11,pp.1326-1333. Causevic M., Oncogene, 2001,v.20,pp.7734-7743.

Таблица 13

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 97	Lipin 1	Один из регуляторов ответа раковых клеток на цитотоксические препараты.	Brachat A. et.al. , Oncogene, 2002,v.21,pp.8361-8371

Таблица 14.

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 121	Dynein	Принимает участие в транспорте белка p53, гиперэкспрессирован при раке простаты и гепатоцеллюлярном раке.	Bull J.H., et.al., Br J Cancer, 2001, v.84, pp.1512-1519. Giannakakou P., et.al., Nat Cell Biol, 2000, v.2, pp.709-717 Jiang J., et.al., Gene, 2001, v.281, pp.103-113.

Таблица 15

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 178	Белок Ramp	Связан с развитием клеток человеческой эмбриональной карциномы.	Cheung W.M., et.al., J Biol Chem, 2001, v.276, pp.17083-17091

Таким образом, из 15 последовательностей с идентифицированной функций или продуктом, кодирующих самые разнообразные продукты (протеинкиназы, ростовые факторы, протеиназа, регуляторные ядерные белки, адгезионные молекулы), 14 описаны в литературе, как имеющие отношение к формированию и поддержанию злокачественного фенотипа. Лишь продукт клона 197, идентифицированный как проапоптотический фактор, формально не установлен как фактор, связанный со злокачественной прогрессией. Однако, ряд литературных данных свидетельствует о возможной связи высокого индекса апоптотической активности раковой опухоли с ее прогрессией (Nishimura R., et al., J Surg Oncol, 1999, v.71, pp.226-234.) и о возможной роли факторов,

индуцирующих апоптоз, в формировании и поддержании иммуносупрессии при злокачественном росте (O'Connel J., et al., Dis Esophagus, 1999, v.12, pp.83-89).

Наиболее представленной из повторяющихся элементов в данном препарате оказалась альфа-сателлитная ДНК (30 клонов). Можно сказать, что по отношению к другим секвенированным последовательностям, альфа-сателлитная ДНК оказалась единственным высокоповторяющимся элементом генома человека, ведущим себя в составе данного образца, именно как повтор. Остальные высокоповторяющиеся элементы либо присутствовали в виде одного или нескольких клонов (вариант L1, и MLT2b), либо не обнаружены среди проанализированных образцов (MER, Alu, THE, MIR, β -сателлиты). Если исходить из имеющихся знаний, что состав ДНК плазмы должен в основном повторять состав ДНК генома, то перечисленные повторы должны были быть представлены в подавляющем числе клонов, в то время как уникальные и умеренно повторяющиеся последовательности вообще не должны обнаруживаться при анализе столь малого числа клонов ДНК. Полученный результат ясно свидетельствует об особом пути образования ДНК плазмы у ракового больного. На это указывает и другой неожиданный результат проведенного анализа - обнаружение в данном препарате фрагментов сразу двух новых умеренно повторяющихся последовательностей неизвестного до недавнего времени типа - дупликонов. Дупликоны были впервые обнаружены в геноме человека менее двух лет назад. Известные дупликоны (Eichler E.E., et al., Genome Res, 1998, v.8, pp.791-808; Ji Y., et al., Genome Res, 2000, v.10, pp.597-610; Pujana M.A., et al., Genome Res, 2001, v.11, pp.98-111) - значительные по размеру участки ДНК, размноженные в числе нескольких копий преимущественно в рамках какой-то одной хромосомы (в отличие от других повторов, которые достаточно

равномерно распределены по геному). Образование и экспансию дупликонов сейчас связывают и с различными генетическими синдромами (например с синдромом Прадера-Вилли/Ангельмана, и с эволюцией мультигенных семейств, таких как МНС (Shiina T., et al., Proc Nat Acad Sci USA, 1999, v.96, pp.13282-13287), и с хромосомной нестабильностью в опухолях.

Следует отметить, что анализ клонов из ДНК плазмы крови больного дал следующие неожиданные результаты.

ДНК плазмы крови больного раком высокообогатена уникальными генами. Из 96 проанализированных клонов 55 клонов содержат фрагменты уникальных генов человеческого генома. Из 15 последовательностей с известной функцией, идентифицированных в библиотеке, 14 генов имеют отношение к процессам прогрессии опухолей и поддержанию злокачественного фенотипа.

В препарате ДНК плазмы обнаружено резкое обеднение по наиболее распространённым повторам человека, таким как MER, Alu, TNE, MIR, β -сателлиты.

Весьма важным результатом является обнаружение в препарате двух последовательностей с характеристиками ранее не известных дупликонов, что свидетельствует о представленности дупликонов в подобных образцах ДНК.

Библиотека ДНК плазмы крови здорового донора

Для подтверждения ценности метода клонирования и секвенирования ДНК плазмы крови для идентификации уникальных генетических последовательностей генома, мы сконструировали библиотеку ДНК плазмы крови здорового донора. Известно, что плазма клинически здоровых людей так же содержит ДНК, правда в значительно меньшем количестве, чем плазма раковых больных (Shapiro B., et al.,

Cancer, 1983, v. 51, pp. 2116-2120). Представительность библиотеки составила около 8×10^5 клонов.

Анализ 70 клонов длиной от 300 до 1000 пар оснований дал еще более интересный результат. Из 70 проанализированных клонов 58 представляют собой уникальные последовательности ДНК генома человека. Из них по данным HumanGenBank лишь для 14 определена функция или продукт соответствующего гена.

Всего 12 клонов содержали фрагменты повторяющихся последовательностей, при этом без предпочтения в отношении альфа сателитной ДНК.

Таким образом, неожиданно установлено, что ДНК плазмы крови здорового и больного раком содержит в основном уникальные фрагменты генома человека. При онкологической патологии уникальные последовательности ДНК из плазмы крови соответствуют генам, продукты которых участвуют в формировании злокачественного «фенотипа» опухолевых клеток.

Основываясь на этом нашем неожиданном открытии, мы предположили, что ДНК циркулирующая в плазме крови больных может являться мессенджером : горизонтального переноса генетической информации при опухолевых заболеваниях, способствуя накоплению и распространению в популяции опухолевых клеток генов, необходимых для формирования и поддержания «злокачественного фенотипа».

Соматический мозаицизм — состояние являющееся следствием присутствия в организме генетически неидентичных популяций соматических клеток. По современным представлениям, многие неопухолевые и неинфекционные (т.н. соматические) заболевания человека (например диабет, атеросклероз, хронические неспецифические заболевания легких и другие), в том числе и процесс старения человека, связывают с появлением и распространением (экспансией) в процессе

развития индивидуума клонов соматических клеток, несущих «мутантные» гены. (Youssoufian H., et al., Nature Rew. Genet., 2002,v.3,pp.748-758; J.Vijg, Mutation Res.,2000,v.447,pp.117-135; R.Erickson, Mutation Res.,2003,v.543,pp.125-136; Andreassi M.,Mutation Res.,2003,v.543,pp.67-86;Anderson G., et al., Trends in Pharmacological Sci.,2003.,v.24,pp.71-76). Ярким примером подобного процесса служит прогрессия митохондриальной гетероплазмы (экспансия мутантной митохондриальной ДНК) при различных заболеваниях и в процессе старения (E.Jazin et al., Proc Nat Acad Sci USA, 1996, v.93,pp.12382-12387; Michikawa Y. Et al.,Science,1999,v.286,pp.774-779; Calloway C. Et al.,Am J Hum Gen,2000,v.66,pp.1384-1397).

В качестве двух альтернативных моделей возникновения соматического мозаицизма рассматривают возможность появления множественных мутаций «de novo» в поликлональной клеточном пуле либо клональную экспансию мутантного клона клеток (Khrapko K., et al., Mutation Res.,2003,v.522,pp.13-19).

В процессе работы над изобретением нами обнаружено, что ДНК, циркулирующая в крови здоровых людей играет существенную роль в развитии соматического мозаицизма, а ее связывание, разрушение или инактивация подавляют развитие соматического мозаицизма. Связывание, разрушение или инактивация ДНК, циркулирующего в плазме крови дает леченый эффект при заболеваниях, связанных с развитием соматического мозаицизма.

Приведенные ниже примеры показывают роль ДНК, циркулирующей в плазме крови больных в развитии нечувствительности опухолей к химиотерапии, развитии метастатического процесса при развитии сепсиса и ряде других патологических состояний. Обнаружен высокий терапевтический эффект от уничтожения, связывания или инактивации ДНК плазмы крови.

Роль свободно циркулирующей ДНК в прогрессии опухолей
Материалы и методы.

Использовалась бычья панкреатическая ДНКаза I (Fermentas) и
рекомбинантная человеческая ДНКаза I (Дорназа; Genetech). Раствор
5 ДНКазы для введения готовился растворением матричного раствора
ДНКазы в стерильном фосфатном буфере непосредственно перед
введением. Циклофосфамид и Доксорубин разводились в
соответствии с указанием инструкции.

В проведенных сериях опытов *in vitro* мы не наблюдали
10 подавляющего эффекта ДНКазы I рост культур опухолевых клеток (при
концентрации ДНКазы I до 100 мкг/мл), ДНК плазмы крови мышей-
опухоносителей получали в соответствии с методикой описаной ранее.

Использовали высокометастатический и низкометастатический
штаммы мышинной карциномы легких Люиса и карциномы Эрлиха.
15 Клетки росли в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной
телячьей сыворотки, 1% пеницилин-стрептомицина в среде с 5%
углекислого газа. Для индукции опухолей у мышей клетки выращивали
до монослоя, отделяли с помощью раствора трипсин-ЭДТА. Клетки
трижды отмывали центрифугированием в фосфатном буфере и
20 ресуспендировали до $0,5 \times 10^7$ в 1 мл. Жизнеспособность определяли по
включению метиленового синего в гемоцитометре. Для введения
животным использовали суспензии, содержащие не менее 95%
жизнеспособных клеток. Использовали мышей линии C57Bl, и белые
беспородные, полученные из питомника «Рапполово». Вес животных
25 составлял 24-26 грамм. Животные содержались по 6-7 штук в клетке на
стандартной диете без ограничения воды. Клетки LLC в дозе 5×10^5 в 100
мкл. фосфатного буфера вводили в мягкие ткани бедра. Опухоль Эрлиха
перевивали под кожу правого бока введением 0,2 мл 10% -ной взвеси
клеток в изотоническом растворе хлорида натрия

В некоторых экспериментах исследовали содержание ДНК в плазме крови мышей. ДНК выделяли по ранее описанному протоколу. Содержание ДНК измеряли спектрофотометрически.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами:

5 Пример 1.

Влияние ДНК азы I при ежедневном двукратном введении на рост опухоли Эрлиха у мышей.

Группа 1 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха (контроль).

Группа 2- 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших

- 10 ДНКазу два раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 1 мг/кг внутривенно в 200 мкл фосфатного буфера.

Группа 3 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу два раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 2 мг/кг внутривенно в 200 мкл фосфатного буфера.

- 15 Результаты экспериментов оценивали по торможению роста опухоли (ТРО), выраженному в процентах к данным контроля, полученных в последний день введения ДНКазы с использованием стандартной формулы.

Размер опухоли через 7 дней после перевивки

Группа	Объем опухоли	Т%	P
1	86+/-12	-	-
2	33+/-6	61%	p<0,001
3	34+/-7	60%	p<0,001

- 20 Полученные данные указывают, что введение ДНК азы вызывает выраженное торможение развития опухоли у мышей.

Пример 2

Использование различных схем введения ДНКазы для торможения развития опухоли Эрлиха.

В наших экспериментах терапевтической мишенью ДНКазы является ДНК, циркулирующая в плазме крови больных. Для обеспечения наибольшего терапевтического эффекта необходимо длительное присутствие ДНКазы в плазме крови в каталитически эффективных количествах. В связи с этим многократное введение ДНКазы должно давать лучший эффект по сравнению с двукратным ее введением в той же суточной дозе.

Группа 1 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха (контроль).

Группа 2- 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу два раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 1 мг/кг внутривентриально в 200 мкл фосфатного буфера.

Группа 3 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу четыре раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 0,5 мг/кг внутривентриально в 200 мкл фосфатного буфера. Результаты экспериментов оценивали по торможению роста опухоли (ТРО), выраженному в процентах к данным контроля, полученных в последний день введения ДНКазы с использованием стандартной формулы.

Размер опухоли через 7 дней после перевивки¹

Группа	Объем опухоли	Т%	P
1	98+/-14	-	-
2	23+/-6	76	P<0,001
3	32+/-6	67%	P<0,001

Полученные данные указывают, что дробное (четырёхкратное) введение ДНКазы при той же суммарной суточной дозе действительно вызывает более значительное угнетение роста опухоли, чем двукратное введение. Содержание ДНК в плазме крови мышей 2 группы по окончании курса лечения составило 38,3 нг/мл, в то время как у мышей контрольной группы 104,8 нг/мл; у мышей 3 группы – 55,1 нг/мл. У здоровых мышей

содержание ДНК в плазме составило 12,0 нг/мл. ($p < 0,01$). Таким образом, многократное введение ДНКазы в течение суток приводит к более выраженному снижению содержания ДНК в плазме больных животных и более выраженному подавлению роста опухоли, по сравнению с 2х

5 кратным введением той же суточной дозы.

Пример 3

Совместное использование ДНК азы и противоопухолевого препарата доксорубицина. Группа 1 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха (контроль). Группа 2- 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха,

10 получавших Доксорубин один раз в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 2мг/кг внутривенно. Группа 3 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу четыре раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 0,5 мг/кг внутривенно в 200 мкл фосфатного буфера и Доксорубин
15 один раз в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 2мг/кг внутривенно. Группа 4-10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу четыре раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 0,5 мг/кг внутривенно в 200 мкл фосфатного буфера. Результаты экспериментов оценивали по
20 торможению роста опухоли (ТРО), выраженному в процентах к данным контроля, полученных в последний день введения ДНКазы с использованием стандартной формулы.

Размер опухоли на 7 день после перевивки

Группа	Объем опухоли	T%	P
1	98+/-14	-	-
2	57+/-10	42	$P < 0,05$
3	20+/-6	78	$P < 0,01$
4	0	100%	

Полученные данные указывают, что доксорубицин самостоятельно угнетает рост опухоли слабее чем ДНКазы. При совместном применении проявляется выраженный синергизм между ДНКазой и доксорубицином, выражающийся в полном подавлении роста опухолей (опухоли не
5 определялись не у одного из экспериментальных животных).

Пример 4.

Влияние ДНК азы на формирование бактериальной биопленки.

Для выявления возможных механизмов действия ДНК-азы на взаимодействие бактерий с организмом хозяина мы оценили её влияние
10 на формирование биопленок.

Эксперименты проводили на модели биопленок, получаемых на поверхности стекла при лабораторном культивировании. Были использованы неродственные грамположительные (*Staphylococcus aureus* VT-209) и грамотрицательные (*Escherichia coli* ATCC25922)
15 бактерии. Бактерии засеивали в синтетическую среду М9 с добавками, необходимыми для использованных штаммов бактерий, в количестве 10^9 бактерий/мл и инкубировали при 37°C на протяжении 72 часов. ДНК-азу добавляли в количество 100 мкг/мл сразу после внесения бактерий. В контроле добавляли идентичный объем фосфатного буфера. Отдельные
20 флаконы отбирали для анализа каждые 24 часа.

Стекла промывали PBS буфером, фиксировали, окрашивали метиленовым синим и изучали с помощью световой микроскопии.

В результате установлено, что в присутствии ДНКазы не происходило образование нормальной биопленки. Наблюдалось только прилипание к
25 стеклу отдельных микроорганизмов, которое не приводило к образованию микроколоний и биопленок.

Контрольные высевы из флаконов для определения числа в них жизнеспособных бактерий, способных образовывать колонии на плотной

среде (КОЕ), показало, что в присутствии ДНКазы не происходит гибели клеток, приводящей к снижению числа КОЕ, по сравнению с контролем.

Таким образом, полученные данные указывают, что ДНКазы не вызывает гибели стафилококков и эшерихий, но мешает их кооперативному поведению, приводящему к формированию биопленок.

Пример 5.

Использование ДНК азы для лечения экспериментального сепсиса.

Исследование проводили на беспородных белых мышах 24-26 гр. Животным в ретроорбитальный синус вводили патогенный штамм *Staphylococcus aureus* VT-2003R в количестве 1×10^{10} бакт/животное. ДНК азу вводили внутривентриально. В контрольной группе по аналогичной схеме вводили изотонический раствор хлорида натрия или пенициллин. Каждая группа включала 10 животных. Введение препарата продолжалось 1-3 дня со дня заражения 4 раза в день по 500 мкг/кг внутривентриально. Пенициллин вводили внутримышечно. Эффективность действия оценивали по числу животных, выживших после гибели последнего погибшего в контрольной группе. В контрольной группе к 3 дню погибли все зараженные животные. Среди животных, получавших ДНК-азу к 3 дню остались живы 6 животных. Защита составила - 67%. Полученные данные указывают на возможность и эффективность использования ДНК азы для лечения инфекционных состояний.

Пример 6.

Уровень свободно циркулирующей в плазме ДНК у онкологических больных и у здоровых доноров.

ДНК плазмы крови онкологических больных и ДНК плазмы крови здоровых доноров отличаются не только своим генетическим репертуаром, но и количеством ДНК, содержащейся в плазме крови. В таблице ниже приведены данные по содержанию ДНК в плазме крови у

10 больных различными формами опухолей и 10 здоровых добровольцев. Выделение ДНК из плазмы и определение концентрации ДНК проводили по протоколу, описанному ранее.

Пациент	Пол, возраст	Опухоль, стадия	Содержание ДНК; нг\мл
1	М, 67	Карцинома легкого T2N2M0	123
2	Ж, 37	РМЖ T2N0M0	78
3	Ж, 53	Карцинома желудка T3N2M1	90
4	М, 54	РТК T2N2M2	340
5	М, 64	РТК T2N1M0	182
6	М, 56	Карцинома легкого T3N2M1	99
7	Ж, 49	РТК T2N1M0	75
8	М, 65	Карцинома желудка T3N1M0	120
9	М, 36	Остеогенная саркома T3N1M2	243
10	Ж, 50	РМЖ T3N1M0	165
11	М, 24	Доброволец	10
12	М, 32	Доброволец	27
13	Ж, 21	Доброволец	45
14	Ж, 19	Доброволец	7
15	Ж, 21	Доброволец	13
16	Ж, 23	Доброволец	89
17	М, 28	Доброволец	11
18	Ж, 32	Доброволец	15
19	Ж, 25	Доброволец	17
20	М, 38	Доброволец	5

- 5 Из таблицы видно, что содержание ДНК в плазме крови здоровых добровольцев значительно ниже, чем в плазме больных различными формами злокачественных новообразований.

Пример 7

Последовательности ДНК клонов, полученных из ДНК свободно циркулирующей в плазме больного злокачественной мезотелиомой.

Клон 1

5 Дупликон, хромосома 15 и Y

Последовательность №1.

Клон 3

Уникальный, хромосома 2

Последовательность №2

10 Клон 8

MLT2B повтор

Последовательность №3

Клон 9

Центромерная сателлитная ДНК

15 Последовательность №4

Клон 10

MLT2B повтор

Последовательность №5

Клон 20

20 L1MC4-like (LINE-элемент)

Последовательность №6

Клон 15

Алфа-сателлитная ДНК

Последовательность №7

25 Клоны 18, 21

Алфа-сателлитная ДНК

Последовательность №8

Клон 24

Уникальный, семейство G protein-связанных белков, хромосома 6

- Последовательность №9
Клон 25
Уникальный, хромосома 3
Последовательность №10
- 5 Клон 26
SatB1/Vimentin/nuclear matrix связывающая ДНК
Последовательность №11
Клон 33
Дупликон, хромосома 10
- 10 Последовательность №12
Клон 32
Альфа-сателлитная ДНК
Клон 35
LTR повтор
- 15 Последовательность №13
Клон 36
Уникальный, хромосома 18
Последовательность №14
Клон 37
- 20 Уникальный, хромосома 4
Последовательность №15
Клон 41
Последовательность №16
Клон 43
- 25 Snf2-related CBP activator protein (SCRAP) Уникальный, хромосома 16.
Последовательность №17
Клон 45
Уникальный, хромосома 3
Последовательность №18

- Клон 47
Альфа-сателлитная ДНК
Клон 51
Уникальный, SRY-бокс содержащий ген
- 5 Последовательность №19
Клон 52
Повтор
Последовательность №20
Клон 53, 55
- 10 Альфа-сателлитная ДНК
Последовательность №21
КЛОН 56
ЦЕНТРОМЕРНЫЙ ПОВТОР
Последовательность №22
- 15 Клон 60
Повторяющийся на нескольких хромосомах ген, содержит MER5A
повтор.
Последовательность №23
Клон 62
- 20 Повтор
Последовательность №24
Клон 65
Уникальный, хромосома 3
Последовательность №25
- 25 Клон 71
Уникальный, хромосома 2
Последовательность №26
Клон 72
Уникальный, хромосома 8

- Последовательность №27
Клон 73
Уникальный
Последовательность №28
- 5 Клон 78
Transposon Tigger фрагмент
Последовательность №29
Клон 81
Последовательность №30
- 10 Повтор (LINE)
Клон 82
Уникальный , хромосома 1
Последовательность №31
Клон 83
- 15 Уникальный ,Fibroblast activation protein alpha; cell surface serine protease,
хромосома 2
Последовательность №32
Клон 79
Альфа-саттелитная ДНК
- 20 Клон 86
Уникальный, высокая гомология с brain testican , хромосома 4
Последовательность №33
Клон 90
Уникальный, хромосома X
- 25 Последовательность №34
Клон 93
Уникальный, хромосома 9
Последовательность №35
Клоны 89 и 92

- Альфа-саттелитная ДНК
Клон 96
Фрагмент LINE.
Последовательность №36
- 5 Клон 97
Уникальный, хромосома 2, Lipin
Клон 98
Уникальный, хромосома X
Последовательность №38
- 10 Клон 102
Уникальный, хромосома 17
Последовательность №39
Клон 99
Альфа-саттелитная ДНК
- 15 Клон 105
Уникальный, хромосома 13
Последовательность №40
Клон 106
Уникальный, хромосома 9
- 20 Последовательность №41
Клон 107
Уникальный, хромосома 8
Последовательность №42
Клон 111
- 25 Уникальный, хромосома 12
Последовательность №43
Клон 112
Уникальный, хромосома 5
Последовательность №44

- Клон 114.
Уникальный, хромосома 8, Interleukin 7
Последовательность №45
Клон 116
- 5 Уникальный, хромосома 1
Последовательность №46
Клон 121
Уникальный, хромосома 5, Dynein
Последовательность №47
- 10 Клон 115; 119; 120
Альфа-сателлитная ДНК
Клон 125
Уникальный, хромосома 9
Последовательность №48
- 15 Клон 127
Уникальный, хромосома 20
Последовательность №49
Клон 130
Уникальный, хромосома не определена.
- 20 Последовательность №50
Клон 124
SatB1/Vimentin/nuclear matrix связывающая ДНК
Клон 133
Альфа-сателлитная ДНК
- 25 Клон 137
MLT1A2 повтор
Последовательность №51
Клон 140
Уникальный, хромосома 2, zinc finger protein, subfamily 1A

- Последовательность №52
Клон 141
Уникальный, хромосома 2
Последовательность №53
- 5 Клон 143
Фрагмент Alu-повтора
Последовательность №54
Клон 144
Уникальный, хромосома 2
- 10 Последовательность №55
Клон 146
Уникальный, хромосома 4
Последовательность №56
Клон 139 и 142
- 15 Альфа-сателлитная ДНК
Клон 148
Повтор (хромосомы 1,2 и 4)
Последовательность №57
Клон 152
- 20 Уникальный, хромосома 16, KRAB-Domain, zinc finger protein
Последовательность №58
Клон 154
Уникальный, хромосома 9
Последовательность №59
- 25 Клон 161
Фрагмент LINE
Последовательность №60
Клон 151
Уникальный, хромосома 5

- Последовательность №61
Клон 150
Уникальный, хромосома 1
Последовательность №62
- 5 Клон 153
Уникальный, хромосома 11
Последовательность №63
Клон 159
Уникальный, хромосома 6
- 10 Последовательность №64
Клон 163
Альфа-саттелитная ДНК
Последовательность №65
Клон 166
- 15 Уникальный, хромосома 12
Последовательность №66
Клон 167
Уникальный, хромосома 18 , cadherin 2, type 1, N-cadherin
Последовательность №67
- 20 Клоны 169, 170
Уникальный, хромосома 18
Последовательность №68
Клон 178
Уникальный, хромосома 1, RAMP: RA-regulated nuclear matrix-associated
- 25 protein
Последовательность №69
Клон 180
Уникальный, хромосома 20
Последовательность №70

- Клон 181
Уникальный, хромосома 18
Последовательность №71
Клон 185
- 5 Альфа-сателлитная ДНК
Последовательность №72
Клон 187
Мег повтор
Последовательность №73
- 10 Клон 188
HSATII повтор
Последовательность №74
Клон 189
Уникальный, хромосома 9
- 15 Последовательность №75
Клон 190
Уникальный, хромосома 1, melanoma antigen recognized by T cells 2
Последовательность №76
Клон 195
- 20 Уникальный, хромосома 10
Последовательность №77
Клон 196
Уникальный, хромосома X
Последовательность №78
- 25 Клон 197
Уникальный, хромосома 1, FAF1: Fas (TNFRSF6) associated factor 1
Последовательность №79
Клон 200
Уникальный, хромосома 8

- Последовательность №80
Клон 202
Уникальный, хромосома 13
Последовательность №81
- 5 Клон 205
Альфа-сателлитная ДНК
Последовательность №82
Клон 206
Повтор
- 10 Последовательность №83
Клон 208
Уникальный, хромосома 8, Human DEAD box RNA helicase-like protein
Последовательность №84
- 15 Пример 8. Последовательности ДНК клонов, полученных из свободно
циркулирующей в плазме здорового донора ДНК.
Клон 1
Уникальный, хромосома 5
Последовательность №85
Клон 9
- 20 Уникальный, хромосома 21
Последовательность №86
Клон 7
Уникальный, хромосома 3
Последовательность №87
- 25 Клон 8
Уникальный, хромосома 4
Последовательность №88
Клон 10

- 18S RNA ген
Последовательность №89
Клон 11
Повтор Alu
- 5 Последовательность №90
Клон 13
Уникальный, хромосома 3
Последовательность №91
Клон 15
- 10 Уникальный, хромосома 1
Последовательность №92
Клон 16
Уникальный, хромосома 3, neutral endopeptidase
Последовательность №93
- 15 Клон 17
Уникальный, хромосома 8
Последовательность №94
Клон 18
Уникальный, хромосома 1
- 20 Последовательность №95
Клон 21
Уникальный, хромосома 19, Zinc Finger protein
Последовательность №96
Клон 22
- 25 Уникальный, хромосома 18
Последовательность №97
Клон 23
Уникальный, хромосома 7, muskelin 1
Последовательность №98

- Клон 25
Уникальный, хромосома 11
Последовательность №99
Клон 27
- 5 Повтор
Последовательность №100
Клон 29
Уникальный, хромосома 6
Последовательность №101
- 10 Клон 30
Уникальный, хромосома 14
Последовательность №102
Клон 31
Уникальный, хромосома 17
- 15 Последовательность №103
Клон 32
MER4B повтор
Последовательность №104
Клон 33
- 20 Уникальный, хромосома 1
Последовательность №105
Клон 34
Уникальный, хромосома 2
Последовательность №106
- 25 Клон 35
Повтор
Последовательность №107
Клон 36
Уникальный, хромосома 1

Последовательность №108

Клон 37

HERVH повтор

Последовательность №109

5 Клон 41

Уникальный, хромосома X

Последовательность №110

Клон 42

Уникальный, хромосома 6

10 Последовательность №111

Клон 43

Уникальный, хромосома 22, KREMEN1

Последовательность №112

Клон 44

15 Уникальный, хромосома 14

Последовательность №113

Клон 45

Уникальный

! Последовательность №114

20 Клон 46

Уникальный, хромосома 20

Последовательность №115

| Клон 47

Nf-kappaB

25 Последовательность №116

Клон 38

Уникальный, хромосома 16

| Последовательность №117

Клон 48

- Уникальный, хромосома 6
Последовательность №118
Клон 53
Уникальный
- 5 Последовательность №119
Клон 51
Уникальный, хромосома 5
Последовательность №120
Клон 59
- 10 Уникальный, хромосома 4, NFkB1: nuclear factor of kappa light
polypeptide gene enhancer
Последовательность №121
Клон 61
Повтор
- 15 Последовательность №122
Клон 62
L1 повтор
Последовательность №123
Клон 64
- 20 Дупликон, хромосома 7
Последовательность №124
Клон 65
Рибосомальная ДНК
Последовательность №125
- 25 Клон 66
Рибосомальная ДНК
Последовательность №126
Клон 75
Повтор

- Последовательность №127
Клон 76
Уникальный, хромосома 4
Последовательность №128
- 5 Клон 83
Уникальный, хромосома 4
Последовательность №129
Клон 85
Уникальный , хромосома 2, phospholipase C, epsilon
- 10 Последовательность №130
Клон 87
L1PA3 повтор
Последовательность №131
Клон 86
- 15 Уникальный, хромосома 5, CRTL1: cartilage linking protein 1
Последовательность №132
Клон 89
Alu повтор
Последовательность №133
- 20 Клон 92
Уникальный, хромосома 6
Последовательность №134
Клон 100
Уникальный, хромосома 6
- 25 Последовательность №135
Клон 105
AluSx повтор
Последовательность №136
Клон 111

Alphoid repetitive ДНК

Последовательность №137

Клон 112

Уникальный, хромосома 9

5 Последовательность №138

Клон 113

Уникальный, хромосома 22

Последовательность №139

Клон 114

10 AluSx повтор

Последовательность №140

Клон 116

Уникальный, хромосома 9, 17kD fetal brain protein

Последовательность №141

15 Клон 123

Уникальный, хромосома 5

Последовательность №142

Клон 124

Уникальный хромосома 13

20 Последовательность №143

Клон 126

Уникальный, хромосома 8

Последовательность №144

Клон 130

25 Уникальный, хромосома 1

Последовательность №145

Клон 131

Уникальный, хромосома 4

Последовательность №146

- Клон 136 .
Уникальный, хромосома 8
Последовательность №147
Клон 141
- 5 Уникальный, хромосома 2
Последовательность №148
Клон 146
Уникальный, хромосома 16
Последовательность №149
- 10 Клон 147
Уникальный, хромосома 5, nicotinamide nucleotide transhydrogenase
Последовательность №150
Клон 149
Уникальный, хромосома 9
- 15 Последовательность №151
Клон 151
Уникальный, хромосома 16
Последовательность №152
Клон 152
- 20 Уникальный, хромосома 6, BAI3: brain-specific angiogenesis inhibitor 3
Последовательность №153
Клон 153
Уникальный, хромосома 10, GAD2: glutamate decarboxylase 2
Последовательность №154
- 25 Клон 155
Уникальный, хромосома 9
Последовательность №155
Пример 9
Чувствительность ДНК, циркулирующей в плазме, к действию ДНКаз.

ДНК из сыворотки свежей крови доноров (смесь от 5 доноров) выделяли стандартным фенол-хлороформным методом.

Осадок нуклеиновых кислот промывали 70% этанолом и растворяли в трис-ЭДТА буфере. Количество ДНК определяли по данным спектрофотометрии при длине волны 260 нм (СФ-46). Полученную ДНК изучали электрофорезом в 0,8% полиакриламидном геле с окраской бромистым этидием. Часть полученной ДНК обрабатывали ДНКазой 1 в течение 3 часов при 37°C. В результате разделения в геле обработанной и необработанной ДНК установлено:

10 Необработанная ДНК образует после электрофореза одну компактную полосу, что свидетельствует о сравнительно идентичных по размеру фрагментах ДНК, циркулирующих в крови.

После обработки ДНКазой полоса в геле исчезает полностью.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что в сыворотке циркулирует ДНК, чувствительная к действию ДНКаз, и что она может быть ими полностью разрушена.

Пример 10

Результаты эксперимента по влиянию поликлональной сыворотки, содержащей антитела против ДНК на продолжительность жизни мышей с карциномой Эрлиха.

ДНК, циркулирующая в плазме крови онкологических больных может быть уничтожена или инактивирована не только разрушающими ДНК ферментами (например, ДНКазой), но и другими способами.

Антитела против ДНК выделяли из крови больных системной красной волчанкой по методике Shuster A.M.(Shuster A.M. et.al., Science, v.256, 1992, pp.665-667). Подобные анти-ДНК антитела способны не только связывать, но и осуществлять гидролиз ДНК.

Группа 1 – 7 мышей с привитой карциномой Эрлиха (контроль).

Группа 2- 6 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получивших на 3й день после перевивки опухоли внутривенную инъекцию фракции человеческих анти ДНК антител (IgG) по 200 мкг на одно животное.

Группа 3- 6 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получивших на 3й день после перевивки опухоли внутривенную инъекцию фракции неспецифического человеческого иммуноглобулина (IgG) по 200 мкг на одно животное.

Эффект определяли по торможению роста опухоли на 7 день после перевивки (ТРО, выраженное в процентах)

10 Размер опухоли через 7 дней после перевивки

Группа	Объем опухоли	Т%	Р
1	85+/-12	-	-
2	45+/-6	52%	p<0,001
3	79+/-7	7%	p<0,001

Результаты показывают, что однократное введение антител против ДНК обладает выраженным противоопухолевым эффектом. Введение фракции антител, не содержащих антител, направленных против ДНК, не вызывает противоопухолевого эффекта.

Пример 11

Эффект вакцинации мышей фракцией ДНК плазмы крови, полученной от животных с карциномой Эрлиха, на перевивку и рост карциномы Эрлиха у иммунизированных животных.

20 ДНК из плазмы мышей с карциномой Эрлиха выделяли по описанной выше методике на 5 й день после перевивки опухоли. В качестве адьюванта для иммунизации использовали положительно заряженные многослойные липосомы. Образец ДНК смешивался с липосомами (20 мкг ДНК в 1 мг липидов).

25 Группа 1 – 6 неиммунизированных мышей

Группа 2 – 6 мышей, иммунизированных трехкратно внутрикожно с интервалом в 1 неделю (1мкг ДНК из плазмы крови в 50мкл липосомальной суспензии, содержащей 50мкг липосом).

5 Группа 3- 6 мышей, иммунизированных трехкратно внутрикожно с интервалом в 1 неделю 50 мкл липосомальной суспензии, содержащей 50мкг липосом без ДНК.

Группа 4- 6 мышей, иммунизированных трехкратно внутрикожно с интервалом в 1 неделю (1мкг ДНК телячьего тимуса (Sigma) в 50мкл липосомальной суспензии, содержащей 50 мкг липосом).

10 Через неделю после последней иммунизации всем мышам, включая неиммунизированный контроль, была перевита опухоль Эрлиха.

Результаты эксперимента оценивали по выживаемости животных на 30 и 50 день после перевивки опухоли.

Группа	30 день (число живых \ павших животных в группе)	50 день (число живых \ павших животных в группе)
1	0-6	0-6
2	5-6	3-6
3	0-6	0-6
4	2-6	0-6

15 Таким образом, иммунизация мышей ДНК из плазмы крови приводит к выраженному увеличению продолжительности жизни животных, привитых опухолью Эрлиха.

Пример 12

Выделение ДНК из матрикса биопленок, образованных грамположительными и грамотрицательными бактериями.

20 В опытах использованы биопленки, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Биопленки смывали с агара фосфатным буфером, после чего клетки и матрикс разделяли центрифугированием. Для выделения ДНК

из матрикса использовали стандартный фенол-хлороформный метод. Количество ДНК определяли по данным спектрофотометрии при длине волны 260 нм (СФ-46). Полученную ДНК изучали электрофорезом в 0,8% полиакриламидном геле с окраской бромистым этидием. Часть 5 полученной ДНК обрабатывали ДНК азой 1 в течение 3 часов при 37°C. В результате разделения в геле обработанной и необработанной ДНК установлено:

Необработанная ДНК образует после электрофореза одну компактную полосу, что свидетельствует о сравнительно идентичных по размеру 10 фрагментах ДНК, присутствующих в матриксе.

После обработки ДНК азой полоса в геле исчезает полностью.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что матрикс микробных сообществ грамположительных и грамотрицательных бактерий содержит внеклеточную ДНК, которая может быть разрушена 15 ДНКазой.

Пример 13

Динамика экспрессия Р-гликопротеина в опухоли Эрлиха у мышей, получающих терапию Доксорубицином, в процессе лечения и эффект ДНКазы I.

20 Лечение Доксорубицином вызывает в ткани опухоли экспрессию Р гликопротеина, одного из основных медиаторов MDR (Multidrug Resistance) фенотипа. Ниже приведены результаты иммуногистохимического окрашивания гистологических срезов опухоли мышей получавших 5 дневный курс терапии Доксорубицином (2мг/кг 25 ежедневно внутривенно) и Доксорубицином + ДНКазы I (0,5 мг/кг; четыре раза в день на протяжении 5 дней). Лечение начинали на 3й день после перевивки опухоли. Препараты тканей изготавливались на 8 день после перевивки опухоли. После 5 дневного курса терапии в тканях опухоли наблюдается интенсивная многоочаговая экспрессия Р-

гликопротеина (Фиг.1). При комбинированном лечении Доксорубицин + ДНКазы как общий уровень экспрессии Р-гликопротеина так и количество Р-гликопротеин позитивных очагов в ткани опухоли значительно меньше (Фиг.1). Таким образом, лечение ДНКазой тормозит в опухоли развитие фенотипа множественной лекарственной устойчивости, вызываемое действием противоопухолевого антибиотика Доксорубицина.

Пример 14

Влияние ДНК плазмы мышей C57Bl с опухолью LLC , подвергшихся химиотерапевтическому лечению Доксорубицином на рост и метастазирование опухоли LLC у мышей C57Bl , получающих терапию Доксорубицином и эффект ДНКазы 1.

Опухоль LLC была перевита 30 мышам C57Bl. На 3 день после перевивки 20 мышей получили курс химиотерапии Доксорубицином в дозе 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течении 5 дней, и 10 мышей получили терапию Циклофосфамидом в дозе 15 мг/кг однократно внутривенно на 3 день после перевивки. Подобный курс лечения не приводит к излечению животных, но приводит к замедлению роста опухоли на 8 день на 50% у животных, получивших химиотерапию Доксорубицином и к замедлению роста опухоли на 8 день на 30% у животных , получивших химиотерапию Циклофосфамидом.

На следующий день после окончания курса химиотерапии животных усыпляли, собирали суммарную плазму крови мышей 1 группы и мышей 2 группы. Суммарную фракцию ДНК плазмы крови после выделения хранили при -20°C в фосфатном буфере.

В эксперименте участвовало 5 групп мышей, привитых LLC.

1 группа – 7 мышей контроль

2 группа – 6 мышей химиотерапия Доксорубицином по схеме 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течении 5 дней с 3 по 8 день.

3 группа – 6 мышей химиотерапия Доксорубицином по схеме 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течении 5 дней с 3 по 8 день + внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции ДНК мышей, получивших химиотерапию Доксорубицином (0,05 мкг ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в 1 й день лечения).

4 группа - 6 мышей химиотерапия Доксорубицином по схеме 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течении 5 дней с 3 по 8 день + внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции ДНК мышей, получивших химиотерапию Циклофосфамидом (0,05 мкг ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в 1 й день лечения)

5 группа - 6 мышей химиотерапия Доксорубицином по схеме 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течение 5 дней с 3 по 8 день + внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции ДНК мышей, получивших химиотерапию Доксорубицином (0,05 мкг ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в 1 й день лечения) + внутрибрюшинное четырехкратное введение ДНКазы I в дозе 0,5мг/кг в 1й и 2й день лечения (по 4 внутрибрюшинных инъекции в сутки)

Размер опухоли на 8 день после перевивки

Группа	Объем опухоли
1	127+/-13
2	67+/-7
3	115+/-20
4	75+/-11
5	82+/-9

Таким образом, ДНК плазмы крови мышей, получавших химиотерапию, специфическим образом способствует развитию лекарственной устойчивости опухолей к химиотерапевтическому лечению. Введение ДНКазы препятствует реализации этого эффекта.

Пример 15

Влияние ДНК плазмы мышей C57B1 с высокометастатическим штаммом опухоли LLC, на метастазирование низкометастатического штамма опухоли LLC у мышей C57B1, и эффект ДНКазы I.

Опухоль LLC была перевита 30 мышам C57B1. Мыши (20 животных) получили прививку высокометастатического штамма и 10 мышей получили прививку низкометастатического штамма. На 9 день после перевивки окончания курса химиотерапии животных усыпляли, и собирали суммарную плазму крови мышей 1 группы и мышей 2 группы. Суммарную фракцию ДНК плазмы крови хранили при -20°C в фосфатном буфере.

В эксперименте участвовало 5 групп мышей, привитых опухолью LLC.

1 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC.

2 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в на 7й и 8й день после перевивки).

3 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым низкометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в на 7й и 8й день после перевивки)

4 группа - 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в на 7й и 8й день после перевивки) + внутрибрюшинное четырехкратное введение ДНКазы I в дозе 1мг/кг на 7й и 8й день лечения (по 2 внутрибрюшинных инъекции в сутки)

5 группа – 6 мышей с привитым высокометастатическим штаммом LLC.

Оценивалось количество метастатических узлов в легких на 15 день после перевивки (N).

Результаты эксперимента представлены в таблице

Группа	Нср.
1	12,0
2	24,1
3	14,6
4	11,6
5	33,6

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что ДНК из
 5 плазмы мышей с высокометастатическим штаммом LLC усиливает метастазирование низкометастатического штамма LLC. Введение больным животным ДНКазы I препятствует реализации этого эффекта.

Пример 16

10 Влияние ДНКазы I на продолжительность жизни мышей C57B1 с привитой опухолью LLC (высокометастатический штамм).

В эксперименте участвовало 5 групп мышей, привитых LLC.

1 группа – 7 мышей (контроль).

2 группа – 6 мышей, получавших внутрибрюшинно терапию ДНКазой в
 15 дозе 1 мг/кг 2 раза в сутки с 3 по 5 день после перевивки

3 группа – 6 мышей, получавших внутрибрюшинно терапию ДНКазой в дозе 1 мг/кг 2 раза в сутки с 3 по 10 день после перевивки.

4 группа – 6 мышей, получавших терапию ДНКазой в дозе 1 мг/кг 2 раза в сутки с 3 по 15 день после перевивки.

20 5 группа – 6 мышей, получавших терапию ДНКазой в дозе 1 мг/кг 2 раза в сутки с 3 по 18 день после перевивки.

Результаты эксперимента оценивали по выживаемости животных на 30 и 50 день после перевивки опухоли.

Группа	30 день (число живых \ павших животных в группе)	50 день (число живых \ павших животных в группе)
1	0-7	0-7
2	0-6	0-6
3	3-6	0-6
4	5-1	3-3
5	6-0	6-0

Хотя во 2ой и в 3ей группах наблюдалось выраженное торможение роста опухолей к последнему дню лечения ДНКазой, после отмены препарата
5 рост опухоли возобновлялся и к 25 дню размер опухолей в этих группах сравнивался с контролем.

Наиболее длительный курс терапии ДНКазой (с 3 по 18 день; группа 6) привел к максимальному продлению жизни больных животных. Торможение роста опухоли к 18 дню составляло более 95%)

10 Во всех экспериментах однократное и многократное введение человеческой ДНКазы I в дозе до 2,5 мг/кг. (наибольшая доза, использованная в экспериментах) не оказывало токсического действия на животных.

15 Таким образом, ДНКаза I не оказывает прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки (в наших экспериментах в концентрации 100 мкг/мл опытах *in vitro*), а полученные в примере данные подтверждают, что противоопухолевый эффект связан с разрушением ДНК в плазме крови, и лечебный эффект ДНКазы возрастает вместе с увеличением продолжительности курса лечения ДНКазой.

Пример 17 .

Влияние различных способов разрушения, инактивации и связывания ДНК плазмы крови на способность ДНК плазмы крови мышей C57Bl с высокометастатическим штаммом опухоли LLC усиливать
5 метастазирование низкометастатического штамма опухоли LLC у мышей C57Bl .

Мыши (100 животных) получили прививку высокометастатического штамма опухоли LLC. На 9 день после перевивки и окончания курса химиотерапии животных усыпляли и собирали суммарную плазму крови
10 мышей. Суммарная фракция ДНК плазмы после выделения крови хранилась при -20°C в фосфатном буфере.

В эксперименте участвовало 6 групп мышей, привитых низкометастатическим штаммом LLC.

- 1 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC
- 15 2 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двухкратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворялись в 500 мкл свежей гепаринизированной крови).
- 20 3 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл. свежей плазмы). Перед введением образец подвергали фотохимической
25 дезинфекции (добавление 1 мкМ метиленового синего с последующим облучением красным светом в течении 10 минут (~60 000 Люкс).
- 4 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим

штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл свежей плазмы). Перед введением образец дважды пропускали через колонку, содержащую DEAE-целлюлозу. 5 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл свежей гепаринизированной крови). Перед введением в образец добавляли 1 мкг фрагмента А растительного токсина Рицина и инкубировали 1 час при 37°C. Рицин является представителем семейства RIP (белки инактивирующие рибосомы) токсинов, широко используемых для создания иммунотоксинов. Кроме способности инактивировать рибосомы эти белки обладают способностью деаденилировать ДНК. Для реализации токсического эффекта каталитическая единица А токсинов RIP II типа должна быть доставлена в клетку субъединицей В. В отсутствие субъединицы В цепь А не токсична, однако полинуклеотид-аденингликозидазная активность цепи А может быть использована для инактивации ДНК, циркулирующей в плазме.

6 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл свежей гепаринизированной крови. ДНК. Суммарная фракция ДНК перед введением подвергалась ферментативному метилированию (I.Muiznieks et.al., FEBS Letters, 1994, v.344, pp.251-254).

Оценивали количество метастатических узлов в легких на 15 день после перевивки.

Результаты эксперимента приведены в таблице.

Группа	Нср.
1	12,0
2	22,5
3	14,1
4	15,5
5	15,1
6	12,3

Результаты свидетельствуют, что все примененные методы подавляли способность ДНК плазмы крови мышей с высокометастатическим штаммом опухоли LLC вызывать усиление метастазирования низкометастатического штамма опухоли LLC.

5 **Пример 18. Влияние терапии ДНКазой I на развитие соматического мозаицизма.**

В качестве модели соматического мозаицизма была изучена частота мутаций гена HPRT в Т-лимфоцитах крови. Человеческий HPRT ген (Хромосома Xq26) кодирует конститутивно экспрессируемый, но не эссенциальный фермент, вовлеченный метаболизм пуриновых оснований. Клонирование проводили по методике описанной Bigbee W (Bigbee W. Et al., Mutation Res., 1998, v.397, pp.119-136). Клонированию подвергались лимфоциты периферической крови 8 больных, получавших курс 3х недельной иммуностимулирующей терапии препаратом Неовир

10 после хирургического удаления опухоли. Из 8 больных 4 пациента дополнительно получали терапию человеческой рекомбинантной ДНКазой I (200 мкг/кг внутривенно, 4 раза в сутки в течении 3 недель). Частота встречаемости HPRT-дефицитных клонов в крови больных, получавших терапию ДНКазой I, в среднем была в 3 раза ниже таковой в

15 крови больных , получавших только иммуностимулирующую терапию.

20

Пример 19. Влияние терапии ДНКазой I на продолжительность жизни старых крыс.

В опыте использовали 24-месячных белых беспородных крыс. В опытной группе (10 животных) крысам, начиная с 24 месячного возраста, вводили полисиалированную человеческую ДНКазу I в количестве эквивалентном 500мг/кг немодифицированного фермента внутривенно два раза в неделю на протяжении 2 месяцев. Крысам контрольной группы вводили плацебо. Продолжительность жизни крыс в контрольной группе составила в среднем 27, 8 месяца. Продолжительность жизни крыс в опытной группе составила в среднем 30,1 месяц.

Пример 20 . Влияние терапии ДНКазой I на жизнеспособность бета-клеток поджелудочной железы и эндотелия аорты

Бета-клетки эмбриональной поджелудочной железы человека и эндотелиальные клетки аорты человека использовали для формирования первичной клеточной культуры. Через 24 часа после пассажа в одной экспериментальной серии в клеточные культуры добавляли ДНК, выделенную из плазмы больного тяжелой формой диабета 2 типа, осложненного системным атеросклерозом (0,0025 мкг на 1 мл культуральной среды) а в другой экспериментальной серии ДНК больного перед введением в культуру подвергали ферментативному метилированию. Через 24 часа оценивали содержание жизнеспособных клеток по включению красителя трипанового синего.

Результаты эксперимента приведены в таблице:

Процентное содержание жизнеспособных клеток через 48 часов после пассирования .

Клетки	Контроль	ДНК больного	Метилированная ДНК
В-клетки	73%	43%	61%
Эндотелий	62%	35%	55%

Промышленная применимость

Таким образом, настоящее изобретение свидетельствуют о том, что разрушение (связывание, инаktivация) ДНК, циркулирующей в плазме крови, при онкологических и микроб индуцированных

5 заболеваний дает выраженный лечебный эффект.

В подтверждение найденного эффекта установлено, что ДНК плазмы крови больных содержит уникальные гены, принимающие участие в формировании и поддержании злокачественного фенотипа опухоли.

10 Связывание, разрушение или инаktivация ДНК, циркулирующей в плазме крови дает лечебный эффект при заболеваниях, связанных с накоплением и распространением в клетках организма соматических мутаций.

1. ДНК, циркулирующая в плазме крови, может быть уничтожена,

15 инаktivирована или удалена из плазмы крови, что может быть достигнуто использованием ДНКаз, сорбентов, антител или других методов, приводящих к инаktivации разрушением, связыванием или модификацией циркулирующей ДНК.

Лечение, направленное на уничтожение ДНК плазмы крови,

20 приводит к выраженному противоопухолевому эффекту при незначительной собственной токсичности.

Лечение, направленное на уничтожение ДНК плазмы крови, в сочетании с традиционными методами противоопухолевой терапии приводит к выраженному противоопухолевому эффекту.

25 Эффективность лечения, направленного на уничтожение ДНК плазмы крови, может определяться путем мониторингирования количества ДНК и генетических маркеров опухоли в плазме крови пациента, получающего такое лечение.

Клонирование и секвенирование ДНК плазмы крови онкологических больных может быть использовано для изучения генетических процессов, участвующих в онкогенезе и идентификации новых генов, связанных с процессами онкогенеза.

- 5 Клонирование и секвенирование ДНК плазмы крови здоровых людей может быть использовано для изучения процессов функционирования генома в норме и при развитии соматических заболеваний и идентификации новых генов, вовлеченных в эти процессы
- 10 Фармацевтические композиции, содержащие компоненты инактивирующие разрушением, связыванием или модификацией ДНК плазмы крови, используются для лечения больных злокачественными опухолями, инфекциями, соматическими заболеваниями или для продления жизни. Для осуществления эффективной терапевтической экспозиции действующего компонента, необходимой для разрушения
- 15 ДНК плазмы и достижения терапевтического эффекта, используются фармацевтически приемлимые композиции и модификации, системы доставки лекарств, обеспечивающие максимальную системную циркуляцию действующего компонента в плазме крови и его контакт с ДНК, циркулирующей в плазме. Основной путь введения —
- 20 внутривенный. Однако могут быть использованы другие методы введения, обеспечивающие поступление действующего компонента в системную циркуляцию - подкожный, внутримышечный, ингаляционный, внутривентрикулярный и др. Дозы и режимы введения при этом определяются природой используемого активного ингредиента,
- 25 зависят от пути введения. Эффект контролируется по уровню содержания и динамике ДНК в плазме крови, наличием в нем опухолевых, инфекционных и других генетических маркеров, и наступлением положительной клинической динамики заболевания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний путем воздействия на биологические мишени
5 внутри организма, отличающийся тем, что биологической мишенью является внеклеточная ДНК, в том числе, циркулирующая в плазме крови.
2. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по п.1, отличающийся тем, что внеклеточная
10 ДНК инактивируется разрушением, связыванием или модификацией.
3. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1 или 2, отличающийся тем, что внеклеточная ДНК инактивируется разрушением, связыванием или модификацией путем введения в организм больного фармацевтического
15 агента, способного разрушать, связывать или модифицировать свободно циркулирующую ДНК.
4. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по одному из пп.1-3, отличающийся тем, что внеклеточная ДНК инактивируется разрушением, связыванием или
20 модификацией путем введения в организм больного фармацевтического агента, в количестве, достаточном для разрушения и терапевтическом режиме обеспечивающем разрушение, связывание или модификацию в течение периода времени, достаточного для достижения желаемого терапевтического эффекта.
- 25 5. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по одному из пп.1-4, отличающийся тем, что в организм больного вводят генетически модифицированные клетки или генотерапевтические конструкции, приводящих к синтезу в организме больного биополимеров, способных инактивировать путем связывания,

разрушения или модификации свободно циркулирующую в плазме крови больных ДНК.

5 6. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1 или 2, отличающийся тем, что внеклеточная ДНК, циркулирующую в плазме инактивируется путем разрушения связывания или модификации экстракорпоральными методами очистки крови.

10 7. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1,2 или 6, отличающийся тем, что экстракорпоральная очистка крови больного от свободно циркулирующей ДНК достигается иммунной или аффинной сорбцией.

15 8. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1,2 или 6, отличающийся тем, экстракорпоральная очистка крови больного от свободно циркулирующей ДНК достигается методами гравитационной хирургии крови.

20 9. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1,2 или 6, отличающийся тем, что экстракорпоральная очистка крови больного от свободно циркулирующей ДНК достигается биологической, химической или фотохимической инактивацией.

10 10. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1 или 2, отличающийся тем, что больного иммунизируют вакциной, содержащей в качестве антигена ДНК, свободно циркулирующую в плазме больного, в том числе, в комплексе со связанными с ней белками.

25 11. Способ лечения онкологических заболеваний по одному из пп.1-10, отличающийся тем, лечение сочетается с хирургическими,

химиотерапевтическими, гормональными, лучевыми
иммунотерапевтическими методами.

12. Фармацевтический агент для лечения онкологических и/или
инфекционных и/или соматических заболеваний, представляющий собой
5 вещество, обладающее дезоксирибонуклеазной активностью и/или
способное инактивировать внеклеточную ДНК, в том числе,
циркулирующую в плазме крови больных.

13. Фармацевтический агент по п. 12, отличающийся тем, что вещество,
обладающее дезоксирибонуклеазной активностью, представляет собой
10 фермент дезоксирибонуклеазу.

14. Фармацевтический агент по п. 13, отличающийся тем, что
дезоксирибонуклеаза модифицирована для достижения лучших
фармакодинамических и фармакокинетических показателей и
представляет собой аналог дезоксирибонуклеазы с повышенной
15 активностью, аналог дезоксирибонуклеазы, нечувствительный к
эндогенным ингибиторам дезоксирибонуклеазы, полисиалированную
дезоксирибонуклеазу, пегилированную дезоксирибонуклеазу,
дезоксирибонуклеаза связанную или смешанную с фармацевтически
приемлемым носителем, в том числе, с синтетическими и природными
20 микросферами, липосомами, декстраном, и другими корпускулярные
природными и синтетическими полимерными носителями.

15. Фармацевтический агент по одному из пп. 12-14, отличающийся
тем, что он дополнительно содержит рибонуклеазу и/или липазу и/или
протеиназу.

25 16. Фармацевтический агент по п. 12, отличающийся тем, что вещество,
обладающее дезоксирибонуклеазной активностью представляет собой
антитела, обладающие нуклеазной активностью, в частности -
поликлональные ДНК-абзимы, моноклональные ДНК - абзимы или их
производные.

17. Фармацевтический агент по п. 12, отличающийся тем, что вещество, способное связывать ДНК, представляет собой антитела, способные связывать ДНК и его комплексы или их производные
18. Фармацевтическая композиция для лечения онкологических и
5 инфекционных заболеваний, содержащая фармацевтический агент по одному из пп. 12-16 в терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.
19. Способ увеличения продолжительности жизни, отличающийся тем, что достигается путем, инактивации внеклеточной ДНК циркулирующей
10 в плазме за счет разрушения связывания или модификации по п. 2-17.
20. Способ профилактики возникновения и развития патологий, связанных с возникновением и развитием соматического мозаицизма за счет разрушения связывания или модификации ДНК по п. 2-17.
21. Метод контроля эффективности лечения онкологических и/или
15 инфекционных и/или соматических заболеваний, а также оценки развития инфекции и контроля эффективности лечения, направленного на продление жизни путем измерения биохимических показателей больного, отличающийся тем, что для контроля подобного лечения используется мониторингирование количества, размера молекул,
20 соотношение фракций, связи с белками, липидами и сахарами, последовательности нуклеотидов ДНК, свободно циркулирующей в плазме крови.
22. Использование ДНК плазмы крови и внеклеточной микробной ДНК для выявления ДНК, вовлеченной в процесс возникновения и развития
25 заболеваний, состоящее в её клонировании, сиквенировании, идентификации генов, уникальных и повторяющихся последовательностей с их последующим изучением.

РЕФЕРАТ

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ, ИНФЕКЦИОННЫХ И
5 СОМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ И
КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ЛЕЧЕНИЯ

Изобретение относится к медицине и ветеринарии и раскрывает
10 новый способ лечения онкологических, инфекционных и
неинфекционных заболеваний, при котором главной мишенью
терапевтического воздействия является свободно циркулирующая в
плазме крови (и других жидких средах) ДНК, происходящая из
находящихся в его организме опухолевых, мутантных, или
15 инфицированных бактериями, грибами, простейшими клеток, а также из
различных микроорганизмов. Описаны новые фармацевтические
композиции и методы их применения для лечения онкологических
заболеваний, инфекционных состояний, вызванных бактериями, грибами
и простейшими, а так же неинфекционных соматических заболеваний и
20 состояний, связанных с накоплением соматических мутаций клетках
организма. Изобретение описывает лекарственные и иммунологические
композиции, а также сорбционные и физико-химические технологии и
способы их применения для лечения злокачественных опухолей и
других заболеваний.

1/1



A



B

Фиг.1

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Tets Viktor Veniaminovich, Genkin Dmitry Dmitrievich
 <120> Способ лечения онкологических, инфекционных и соматических заболеваний, методы контроля эффективности лечения, фармацевтические агенты и композиция для осуществления лечения
 <210> 1
 <211> 485
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 1
 acgacggcca gtgagcgcgc gtaatacgac tcaactatagg gcgaattggg taccggggccc 60
 cccctcgagg tcgacgggat cgataagctt gatatcgaa tctgaccacc ccaagggtggc 120
 catccttgtc cctgtgattc cagatctcca gaactggagg tctagcttca gggaaaaccc 180
 agattttctt ggcttagccc acctgacagc taatcactgg aaatgggggtg ggctggtaga 240
 gtccttttgt caggttttgt gtcaagagag ggaggaggaa agatgggagg gaggtagcaa 300
 aactgggtctc aatggaacta tgtaagttaa tatagaatgg caaagggatg tttcttccaa 360
 ggaaagaatt cctgcagccc gggggatcca ctagtcttag agcggccgcc accgcggtgg 420
 agctccagct tttgttcctt ttagtgaggg ttaattgcgc gcttggcgta atcatgggtca 480
 tagct
 <210> 2
 <211> 244
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 2
 gaattctcaa attattactg aggaaaatgt gacagtgcctt caaagcagta gtaattttttt 60
 ctcatatgac tgcatttatt attaaaacca acagtggaca gtgaatgact aactgacact 120
 tttttgggaa tattacttcc aaatgaacgt taacttaag attggaatat gaacacacta 180
 ttgcttttac actagagagg ttactcctgg ccactctttc agcagcagtt agcttcagga 240
 attc
 <210> 3
 <211> 230
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 3
 gaattcgcag taacttcctt gtgttggtgtg tattcaactc acagagttga acgatcgttt 60
 acacagagca gacttgaaac actctttttg tggaatttca agtggagatt tcaattgttt 120
 gaggtcaatg gtagaatagg aaatatcttg ctatagaaac tagacagaat gattctcaga 180
 aactcctttg tgatgtgtgc cttcaactca cagagtttaa cctttctttt
 <210> 4
 <211> 218
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 4
 gaattctcat gaaattgaaa tggatggact catcatcgaa tggattcgaa tggaatcatc 60
 gaataaaatt gattgag(a)at catcatcaaa tggaatcgaa tggatcatt gaattggaatc 120
 gaattggaatc atcatcagat ggaaatgaat ggaatcgta tagaatccaa tcgaatggat 180
 tcattgaatg gaatcagatg gaatcatcga gtgactga
 <210> 5
 <211> 182
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 5
 gaattctcta caggacaga actaatggaa tataatgtatt atacagggga gtttattaaa 60
 cattaactca catgatcaca aggtcccgca ataggctgtc tgcaggcagg ggcgaaggag 120
 gccagtgaag ttccaaaact caagaacctt gagtcaatgt tcaagggc(?)a ggaagcatcc180

2/24

ag

<210> 6

<211> 152

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

gaattcacag aaatcatcgc cacaggcaag atctgatgaa ccttgatgaa tgctaaaatt 60
 agttggtgaa agtttaajca gaaacagaat gtttgcatag aatgaagcaa aagaaggaaa 120
 aaaaattatg agcccttgat ttaggggtct tt

<210> 7

<211> 131

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

gaattcttct gtctagagta acatgaagaa atcccgtttc caacgaaggc cctcaaggcg 60
 gtcaattatc cacttcgaga ttctacagaa agagtgttcc aaaactgctc tatcaagaga 120
 aatgttccac c

<210> 8

<211> 239

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gaattcccag taacttcctt gtgttgtgta cattcaactc acagagttga acgttccctt 60
 agacagagca gatttgaaac actctttttg tgcaattggc aagtggagat ttcaagcgct 120
 ttaaggtcaa tggcagaaaa ggaaatatct tcgtttcaaaa actagacaga atcattccca 180
 caaactgcgt tgtgatgtgt tcgttcaact cacagagttt aacctttctt ttcatagag

<210> 9

<211> 207

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

gaattctcta gacttccttg ggtttagcgc tgagtgaaga ggcacggaga gggtttgag 60
 cttaggggta aagcactgat ggaagaaagg aattcctgca gcccggggga tccactagtt 120
 cttagcgggc cgccaccgcg gtggagctcc agcttttgtt cccttttagtg aggggttaaaa 180
 gcgcgcttgc gtaatcatgg tcatagc

<210> 10

<211> 223

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

gaattcatcg ctaggactgt gttcttggtt attgggatgg gaaggagag aaaagatgag 60
 aggggcaaaa gagaaaattt tggaaaatga gaaacttact ttattgcact gtctgtgcaa 120
 ttgttggtct taaggaacaa atacactaaa ttcaaagatg ataaaaaaaa aaaacagctt 180
 cacagagctg tagtaaacac cagatgttga aagagaagcg tat

<210> 11

<211> 198

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

gaattccatt tgatgacaat tccattcaat accaattgat gatgtttatt tttgattcca 60
 tttgatgatg attacattcg attccatttc atcatgattc cattcgattc cactcgatga 120
 ttccattcga ttccattcaa tgattattcc acttgagtcg attcgatgac tccattcgat 180
 tgtattcgat ggtgattg

<210> 12

<211> 217

3/24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

```

gaattctgcc aagcagcgac ttgattcatg aacactcact ggatgctgac tctgttgctc 60
ttctgagtgct tggggtagag gagaggatga ggtggacgca cagttcttgc ttttatgagc 120
ttatgttcta ggaaattcaa acaagtattt tttcaggcag gtagtatgaa atagcaggaa 180
gaggaagcag gctaaaaggga cacagagtga ttggggg

```

<210> 13

<211> 223

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

```

gaattcaggg ctgcagaaat ttgtgtaagt aaagaggagc agaatgttaa tagccaagac 60
aatgcaaaaa atgcaticaa ggtgttttga aaccttcatg gtagccctc ccattacaag 120
cctggaggnc tgggaggga aaataatccc tgaaccagga caagggccct atccctattt 180
ctctgtacag tctcaggaca cagcactttg catcccagca gct

```

<210> 10

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

```

gaattcgctt acagtcagtt acaaatgctt tttagatctt caatgcttct gtgaagcctc 60
atatttgctg ttcagacaga cactataatg gagatggaat aaatggacag caactacaca 120
ggacggtgtg ggcagatggt gttggagcga ggggtgcagg tggagccac aggagaggaa 180
ggctgattga tcttctatgg ggagagcttc atagcacggg ggtggggcac acctgactgg 240
caagctgttt ggtgtgag

```

<210> 15

<211> 239

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

```

gaattctttt gaactagctg tgttttgaca gaggtttttt tttttttttt tctttttttg 60
gttttttgct tctctgacaa aggccttttg aagaatgagc ttcttcccc acatctttat 120
ttattttatt atttttaagc tatgctcagg aaaatgaaca tttctccttt gcagttgata 180
acagcattta caaggtatac agcatatagg gttgttccaa attccttccc agataacca

```

<210> 16

<211> 226

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

```

gaattcctga atgggtggg(6)6 tactgtgtgt ctctggccct attccctctc caggacaaac 60
ctcacccttt cctgcaaagt tactcaaaat agtacattta tccacgtcaa ttcagcaaag 120
gctgcagatc ctgggactac agtatctcag acgctgttct cagcgagctc atggtccagt 180
ggagagcaca gacaaacagc aaggcaggag aaatcgccct tgaagagccc agggag

```

<210> 17

<211> 156

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

```

gaattcagcc gtggcagtga gatggagtgt gtgttttagaa ctgttgattg atctggctct 60
ccctgattag gaggccgaga tgcgactcgt gattgctgag ctgcggaagg agggtttctg 120
gtcactgaag aggctgccta aggtgccaga gcccc

```

<210> 18

<211> 191

<212> DNA

4/24

<213> Artificial Sequence

<400> 18

gaattctaca aaagaaataa agcagagatg tgaaaggaat ttcttcaact atacacattt 60
 tgacataatc atcttctaac atgggtgttta atttgctctg cttcacttag caatgatata 120
 atgaatattt cccattttat tatatatattt acaatatcac tttgaatgac tctcttaaga 180
 gtgtattata c

<210> 19

<211> 312

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

cgacggccag tgagcgcgcg taatacgact cactataggg cgaattgggt accgggcccc 60
 ccctcgaggt cgacggtatc gataagcttg atatcgcttg tg6gctgaag gatgcaattc 120
 tagacagagt tagctgggaa tgcctcactg agaagggggc atttgagtaa aggcctgaaa 180
 aggtgaagaa gaattcctgc agcccggggg tccactagtt ctagagcggc cgccaccgcg 240
 gtggagctcc agcttttgtt cccttttagtg aggttaatt gcgcgcttgg cgtaatcatg 300
 gtcatactgt tt

<210> 20

<211> 219

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

gaattccagt ggaatcagtt gtaatgtctc ctttttcata tctgatttta tttagtgtct 60
 ttttttctta gatagtcttg cttaaagggtt ctcaatttat cttttcaaaa aatcttttca 120
 ttttggtgat cttttttatt attttcttca tttcattttt atttatttct gctctgatct 180
 ttattatttc ttttcttcta ataatttttg gtttagttt

<210> 21

<211> 208

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

gaattctcag taacttcctt gtgttgtgtg tattcaactc acagagttga acgatacctt 60
 acacagagcg gacttgaaac actctttttg tggaatttgc aagtggagat ttcagccgcg 120
 ttgaggtcaa tggtagaaaa ggaaatatct tcgtataaaa actagacaga atgatttcca 180
 gaaactcctt tgtgatgtgt gtgttcaa

<210> 22

<211> 262

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

gaattcaatg gaatggaatg gacaggaatg gaatggaatg gaaaggaatg gagtggaatg 60
 gactagaatg gaatggaatg gaatgaaatc aaccgattg gaatggaatg gaatgcaatg 120
 gaatggaatg gaatcaactg gaaaggaatc aaatagaacg gaatggaata gaatggaatg 180
 gattggaatg gaatggaatg gattcaaccg gagtggaatg gaatggaata gaatggaata 240
 aacaacgagt ggaatggaat gg

<210> 23

<211> 218

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

gaattcgttg aggagcttct ggaaagtgc cattctgact cagcaggtat tggagtctgc 60
 atttctcatg agcactcagg tgatgaaaga gctggtcctt ggacacagct ctgaatagca 120
 agggaatagc tttccttttag agaaatctgg aaaaagaacc actggagagc aatttaaaaa 180
 ataacagaat ccagggaaag ctttaatttc cttttatt

<210> 24

5/24

<211> 213

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

```

gaattcaaag gaatcatcat caaatagaac ogaatggaat cctcattgaa tggaaatgaa 60
aggggtcatc atctaataga atcgcatgga atcatcatca aatggaatcg aatggaatca 120
tcatcaaatg gaatcgaatg gaatcatcat caaatggaat ctgatggaat cattgaacag 180
aattgaatgg aatcgatcat gaatgaattg aat

```

<210> 25

<211> 229

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

```

gaattctgtg cgtatttttag aagtagaatt ataagatttg tggatatgtt agttttggag 60
tgtgaggtca aaggcgtttt gagcaacttg taagaaacca tttttaaggc ggaagtcggg 120
aattttgttt tttatatgtt gaatttgaaa tccttattaa acatccaagt ggagaggctg 180
gatagacaat taaattttaga ccctgagggt cggaaggaa gtccaatgg

```

<210> 26

<211> 216

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

```

gaattcttca agaaacatca aggagggatg tatagatagt tttttaaaaa accgaaatgt 60
aaaagaaata caagaagaat ggaaacatct acataacgag agtggaaaga aatgaaaata 120
gaggtagata gattagatag atagatatag agatgattg attgatggat tgatagattg 180
atagatatag aaataaaaga aagaaaatag aagatg

```

<210> 27

<211> 244

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

```

gaattccaat gcaatgttaa acagaaagca gccctttttt tcaaaattta taggcaaggt 60
gtttaacata tggctaaata atgttaattt atagtaaata tccttcataa ggatgaagat 120
gtacccttct atttttagttt gctgagtgtc ttttagtcat aattgagtgt tgacatctgt 180
caaatatttt ttctgcatct attaagacat ccatgtgata tttctctttt attctcttac 240
tatg

```

<210> 28

<211> 237

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 28

```

gaattcaatc accatcgaat acaatcgaat ggagtcatcg aatcgactca agtggaaata 60
tcattgaatg gaatcgaatg gaatcatcga gtggaatcga atggaatcat gatgaaatgg 120
aatcgaatgt aatcatcatc aaatggaatc aaaaataaac atcatcaatt ggtattgaat 180
ggaattgtca tcaaatggaa ttctgcagc ccgggggatc cactagttct agagcgg

```

<210> 29

<211> 184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 29

```

gaattctttc cagaagggtt ttaattttact ttgctcggct ccatcagggg aatcactatg 60
gcagctatag ccttaagaaa tttattttctt aaataagact tgagagtcag aattgcttct 120
ttatccatgg tctcgaggat gggatgttgt gatagcagpc gtgaaaacaa cattcatctc 180
ctgg

```

<210> 30

6/24

<211> 191

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 30

gaattcagaa tctggatggc aaggaagcgc atcaagatgc aggagaaagt tgaaacctaa 60
 tccaaggaat acagtaaac aatccagaag cttgaaagac aaaatagcca ttttaagaac 120
 caaactgagc ttctggaagg gaaaaattta cttcaagaat ttcataatac aatcaaaagt 180
 attttttttt t

<210> 31

<211> 143

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 31

Gaattccgct tggggaggga actgtcttcg tccaggaaaa tgtttttnat aagccaccca 60
 tggtaaaagg agaagtcagc acggttaggg tggtggcagg aatcaaatta agaaaaggaa 120
 tggctatcca tccggttgta tgt

<210> 32

<211> 169

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 32

gaattctaga ctgctgcacc tccatatacct cagcaactgg catgatgatg agcaggggagt 60
 tagtagaact aatacactaa tatgtaaatg aatgaatgaa tgtttctga gtgtggcctt 120
 aagtttctca gaagaagaca gttcatacac tgggtgcataa aattctggg

<210> 33

<211> 124

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 33

gaattctagg acaaggtgat tgtcctagat tttctcttaa acgcctcctg ttagatagga 60
 aatggccatt aatagagaag cttgcttgag ggagtaaccc tgaaagccca ggcctggaca 120
 cccg

<210> 34

<211> 214

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 34

gaattctaag tttatatagg ttacaacatc acagtaagaa tgtcacagag gggatatatgc 60
 ttttcatcaa acaacaaatt gaaaattttt taactcttaa ggactgattt tgcttaacta 120
 caagttatgc actgatggta gtagcttcac aaatttagaa aagttccaaa ataatgctta 180
 gaaagagtag ctatttaact tctcattgaa caaa

<210> 35

<211> 164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 35

gaattcctgt gaatgtcgtt tcaaataatta ctacgcctac gcactgacca gaacttattt 60
 tttacagaat cattttgaca ggaaaagtgt ttatgatagt tttgttggtg ttgttggtgt 120
 tttgtttttt catcaccag gctgcttcac atttagagct gagt

<210> 36

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 36

7/24

gaattctgag aactagccct ttaagactgg tggagattta ttcaggaggg aagccctgcc 60
 ccaggga aaa gttgccaaga gacttgtntt taggagatca 'ccagcccaaa tttccatga

<210> 37

<211> 208

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 37

gaattccctt catatTTTTtG gtcaaagccc agtttttctg agtcgggtggg ctAAatggga 60
 ttactctttc taatgaggca tccttggtgtg cttagaatca ctcttgactt tatcctgtcc 120
 ccctcgggtt cctaacttac caggatggag agcatttcct cattccatgt tgttgggagg 180
 ttggcccaact gggtgacatc agcccgag

<210> 38

<211> 169

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 38

gaattcctta acccttaatt agcttttggtt tttgctcaat atcctgaagc tgggcacagt 60
 ctcaatgtaa ctattctcct aggggctgaa ctgggtgcta gtcacaaaag tttggaatgt 120
 cattttagaa gcaacctcta gaagtaatcc tggtaagccc tagaagtaa

<210> 39

<211> 172

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 39

gaattcccat ctttttttGt gtgtgtgttt gagactgtat tttgcattgt cgtccacact 60
 ggagtacagt ggcgtgatct ccgctogctg caagctccgc ctcatggatt taagcgattc 120
 tcctgcctca gcctcccaag tggctgggac tacagggtgcc cgaccaacca cg

<210> 40

<211> 137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 40

gaattctgtt acttggtgat gggaaaccgt gaaggtttta agcaagactg tgatgtgctt 60
 aggtttatta gaaggttcta tgctgtcag cctccctgtc tagttctttg ctttattgac 120
 tgtntcctca ctAAatg ;

<210> 41

<211> 152

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 41

gaattctttt ttccccagct ttatggagat ttaattgaca aataaaatgg catatattta 60
 ggtgtatata tttgatata gtatacattg tgaaacgatt actataatga agttaattaa 120
 caatttctc atcttgcata gtcaccattt tt

<210> 42

<211> 183

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 42

gaattctcca tgaaaacaga catatttgat atttaggtgc tttaatggac cctgaaaaga 60
 aattagattg attcatttga agaataaatg tcgggtcccc gccctctaca tggtaaaact 120
 cttccaaatg cttctactta atggaaatgg aaattacctc tcaaaacatt acaaaaaacta 180
 atg

<210> 43

<211> 162

8/24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 43

gaattccgac cactgctgac cgccaggcca cacaccgggtt ttnttcagga ggtctcaact 60
 agatgctaag ctccgaagtg gaactccctc aggcaatttc tgttctaatt caggaattcc 120
 tcgagcccgg gggatccact agttctagag cggccgccac cg

<210> 44

<211> 189

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 44

gaattctgtg aaataattct cagcccagac ccaaggg(a)tc cacagctcag aaatagggtta 60
 tccagaagtg ttcctaacac tagatgacag tatcccagtg ctccaaacca gcttattact 120
 tggccagaat tctgcagcc cgggggatcc actagttcta gagcggccgc caccgcgggtg 180
 gagctccag

<210> 45

<211> 190

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 45

gaattctctg tctgtcgatt tcagtgattt tagtgctgggt cctccacttg agtactagcc 60
 ataggtcttg gcttggcact cccatcccat agccctgtgc accatagctc tgggggtgaac 120
 tcaggcaaaa cgattttcgt ccccagcttg ggagcagcag ggttggggac cttggcaatg 180
 gcaatggcag

<210> 46

<211> 266

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 46

gtaatacgac tcaactatagg gccaattggg tacccgggcc cccctcgagg tcgacgggtat 60
 cgataagctt gatatcggtt tatcctgagc taggctgagc ctttgctctc ctgacctagt 120
 tagtttctcat tcaaccctgt gacaagggat gtggggctca gagaacggga ggtcttccc 180
 tcaggtcaca tggccagggc atggagaggc aggacttgaa tccaggtcaa tgtgaccca 240
 gagcctagtg tggaaacccg tccttt

<210> 47

<211> 164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 47

gaattctacc ctgggtagga tagtagctcc cctcaacttt acagcaaata cagctaacct 60
 tgctttacct gcgatcccgt ntttattttg ttgaattaga gaaactgagg gaagcagttc 120
 tctacactca ctttaccctt agagccctct acaatcaacc ctgt

<210> 48

<211> 112

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 48

gaattcaaag actgtnagat gtaagcagtg actganacan aggcaatgag atgagaggtg 60
 gaaaggagac caaatgtaaa agacagcaga aacttgagtg gacgggtggca ca

<210> 49

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

9/24

<400> 49

gaattctgtt ggctttacct ttaacgtgtc caaaagtgc'caattatcat tncgtcnttt 60
 ngctgctact tggntcaagc cattagatc ccttgctcca ataaactctt tcct

<210> 50

<211> 206

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 50

gaattcccag taacttcctt gtgttgtgtg tgttcaactc acagagttga actttcattt 60
 acacagagca gatttgaaac actctttttg tgggaatttg aaatggagaa ttctgcagc 120
 ccgggggatc cactagttct agagcgccg ccaccggtt ggagctccag cttttgttcc 180
 ctttagcgag ggttaattgc gcgctt

<210> 51

<211> 169

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 51

ccccccctcg aggtcgacgg tatcgataag ctggatatcg gcaacttctc gctctgtcct 60
 cacatagggg aagaggaagc tgttgccttc ctcttacaag agcactaato tcacatgggt 120
 gtttacctc atgactttat ctaaactaa ttatctttca aagaatcta

<210> 52

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 52

gaattcttgt tttcagtga aatttagata atttatctca ggaattcctg cagcccgggg 60
 tttccactag ttctagagcg gccgccaccg cgggtggagct ccagc-t-tg ttcccttttag 120
 ttaggg-taa ttcgcgcttg c

<210> 53

<211> 203

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 53

gaattctata tatttcccct cttttcctga ctcttcagtg acaatcctaa gaccgtgcta 60
 ataacagaag acagtaatcc ctttttttag ccaataatt tggagccat gattttcctt 120
 gcatatcatg aaagtgaacca tgggtgttga tattgtgggt agaagctttc aagtaaaaaa 180
 gaactgtcat tcaactgaat tgg

<210> 54

<211> 162

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 54

gaattctagg ccaggcgcgga tgggtcacac ctgtaatccc agcattttcc cgggaagcca 60
 aggcaggcag atcacttgag gccaaagatt caagaccaac ctggccaaag gggtgaaatc 120
 catctctact aaaaatacaa aaattagtcg ggcgcggcgg cg

<210> 55

<211> 193

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 55

gaattctatt tctaggaacg ttctcaaaca agcttaagag caaagtataa aaacgatgtt 60
 cagcatataa taatatgaaa aaattttgtc ctagacattt tatatgaaaa tgtatacttt 120
 agagcatgct tcaggaaaaa aagaaagaaa aattaatcct gggaaatggg tgacattaga 180
 tacaggcgag tgg

<210> 56

10/24

<211> 169

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 56

gaattctgct tttatgagaa gtcagctgaa tgctatggaa aggagtatag agagtggctt 60
 aaaagtttca ggcaagttca caccaaaact tgcattctaa cctccctgaa cctgtggtct 120
 agaagggacc tatkagcaag atgataacca aaaatgtcta gaatctgag

<210> 57

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 57

gaattctaga gaacaatccc tactgacttc acacacaact taagaaatgc aagtaaaggg 60
 ccgggcgcgg tggcccagca cctgtaatcc cagtactttg ggagcctaga ggcaggtggt 120
 cattggaagt caggagttca a

<210> 58

<211> 183

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 58

gaattctctg atgttttagtt aggtatgacc tacagttaaa ggctttgctg cattccttac 60
 gttttagagg tttctctccg gtatgactac ttcgatgtcg agtaacggac gttgaattac 120
 gataaaaggc tttgccacat tctttgcatt tatagggttt ttctccagta tgaattccag 180
 cag

<210> 59

<211> 185

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 59

gaattctatc aatgtcaatt aaatccagtt gatggatggc cataatttta aatctattta 60
 cattttggg tatttttta aataaaatct gtgattatct atcttttaaat gaatgcctta 120
 gatcattcac attaaagtga ttgttgttgt agttgtgttc atgtatacca tacttataac 180
 tgttt

<210> 60

<211> 163

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 60

gaattctact aaaacttttag aaaagaaatt aacaccaatt ctcaaactat ttcagaaaaat 60
 tgaaaaggag aagcctctcc caactaattc tatgaatcca gcattacccc ttaccaaaaac 120
 cagacaaaga tgaacaaaa taataagaag aaggaactct ggg

<210> 61

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 61

attttccctg ctgggtgtgt ccagagatcc tttctggcta gtctgctagc actgcatgtg 60
 tcnaccagca tctcaacctc aactagctg caacacttgg cca

<210> 62

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 62

cctctccaaa aagaaaatct ctgccattct atgtacactg gctgcatgaa gatgtatgtn 60
 tatgaattag cctgcatgtc tgggtccac cctgcacatg ctaacattcc tttccctccc 120

11/24

catacgagtc caaaaaaact atgc

<210> 63

<211> 173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 63

tcagtcttca ggtgatactg aaatggaggc tgtaagggtt taataatata ggtttcaaaa 60
 ccaggcagca acacatacta gccatgtaaa acttgagcta cccaaccgc cctgggtgtt 120
 gcttagtcct tctttgaaaa ttaaaattct gttctctgga aatagtattt agg

<210> 64

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 64

ttacaacctt tatgagattg gtgccattat caccattttc agacatgaaa aatacagcac 60
 acacagttta agtaatatgc tgaattcctg cagcccgggg gatccactag ttctagagcg 120
 gccgccaccg cgggtggagct ccagcttttg

<210> 65

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 65

ccagtaactt ccttgtgttg tgtacattca actcacagag ttgaacgttc ccttagacag 60
 agcagatttg aaacactctt tttgtgcaat tggcaagtgg agatttcaag cgctttaagg 120
 tcaatggcag aaaaggaaat atcttcgttt caaaactag

<210> 66

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 66

tccaatcct tctgtgact caagcntctg ctcataggt atcctaggac aatattatgc 60
 tgtntctatc aga

<210> 67

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 67

agccagagcc aagctctctc actctgcaga gaagcctcag tctttagaag acagttcagc 60
 tttatccaga attcctgcag ccggggg

<210> 68

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 68

tatgatcaac aaatatatct tacaacatga ggggtgcaata agatgagaaa ggttcgagag 60
 tgtttatctt tagcaaatac atactatcgc gctcaaggta agtnttcaag

<210> 69

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 69

Tattgtgcc agagataatt gtcctgcagt cagagcattc tatgtntttt tctgtcgttg 60
 attaatacag agggtttcag gcttccctgt aggaaaptgt cttaaagcata a

<210> 70

<211> 138

12/24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 70

attcatttat accctcattt attcatccaa cagccattca ataagcgtct gtgttcagcc 60
atgctctgac actgattgan ttctgcagc cgggggatcc actagttcta gagcggccgc 120
accgaggtgg acgtcagc

<210> 71

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 71

caggttgatg aagaaacgga tattagtgc atgaagaaca gtcctgtctc tgtcagctgg 60
tcatttttta tatgtcagag actgtcgaat ttctattgcg tttcaactaa ttacctcagt 120
ttgttaaaac tgaatatgaa ttcc

<210> 72

<211> 113

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 72

ntctatctag ttttatatga aganatcacg tatcacacga tggacccaaa gaggtccaaa 60
tatccacttg cagttctaca aaaagagtgt ttcacaacag cactatcaag agg

<210> 73

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 73

tacattcttt ttcttaacta tccaccacct cccotcaaaa ttttaacagc atccagcctc 60
acaaaactca gatcttcctt gtgtacagtt ccacttt

<210> 62

<211> 143

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 74

gacaattcca ttcaatacca attgatgatg tttatttttg attccatttg atgatgatta 60
cattcgattc catttcatca tgattccatt cgattccact cgatgattcc attcgattcc 120
attcaatgat tattccactt gag

<210> 75

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 75

aatgataat atagtcaatt caggaaagan aatcatccta anatttcgta ttatgattag 60
aagtgttaatt tcgctganat agaaaatttc tcattatt

<210> 76

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 76

agctgacatt gtaatttaaat aaagctaagg ataaaacttc tgggtttttt gtttattgag 60
cccgtgact agaagagata agagatgg

<210> 77

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 77

13/24

ctctgggttgt tg-cagggtt ttnattatta gattccagaa ttcctgcagc ccgnggatc 60
 cactagtctt agagcggcgc ccaccgcgtt ggagctccag .c

<210> 78

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 78

aaggttacag tgagctatga tccaccactg cactccagca tgggcaacaa agcgagaccc 60
 agtattttaga tttatttgtt aatagccagg catattggta catgcgtgt

<210> 79

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 79

ctatatcaca tactttattg tcttgtacag tttgctttgt ttcattgtgt gataccctga 60
 nttcctgcag cccgggggat ccactagttc tagagcggcc gccaccgcgg tggagctcca 120
 g

<210> 80

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 80

ctatgagtgg cctccaagga gcattagatt agaaggtggc tggaggggtg atattttcat
 acacagagac aaagctcccc atcccacaac agatccagag tctgtnttgg accacagga
 aggaaggccc ttctccagga ttct

<210> 81

<211> 160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 81

ttaggagagg tcagagtggg ctggagcagc cagggtgagcc tttgttgtgt aggcaggagg 60
 aagaagcagt ggattttgag ttgaggacgg aatttgagag ggggagggaa aaggaaggga 120
 atccgcagag gcagagctga ctgcactcgt gagggagggg

<210> 82

<211> 164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 82

atacaaattg cagactgcag cgttctgaga aacatctttg tgatgtttgt attcaggaca 60
 gagagttgaa cattccctat catagagcag gttggaatca ctcttttgt agtatctgga 120
 agtggacatt tggagcgctt tcaggcctat gttggaaaag gaaa

<210> 83

<211> 164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 83

ttgtggttct agattttatg gtctcttttt tatttttcat tttttgagac caagtttcac 60
 tcttggtgcc cggctggagt gcagtgcgc gatcttggct caccgcaacc tctgcctcca 120
 ggattcaagc gattcgcctg cctcagcctt actgagtagc tccc

<210> 84

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

14/24

<400> 84
 tagttccagc tataaccactt tctagccttc ttgattttgc tgaactgaga gtcagaagag 60
 atatgtntct aggttatttc caatcattat gccatctcgg aagtggcagg ggtgctatac 120
 tagactgaga caaatacccc a
 <210> 85
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 85
 cttctaaaat tctatggtag tatganaggc tacacaaaag tntttggacc tgatacaaat 60
 attataaatg at
 <210> 86
 <211> 135
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 86
 tcataaaata accattaata tttcactttc gttttttatc ctaacctttt tctaacacat 60
 aaacatattc attgggaggt cgaggcgggc ggatcacgag gtaggagatc gacgaccatc 120
 cggtaaaagg tgaaa
 <210> 87
 <211> 107
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 87
 cagccccaag aatgtctgga gcccgagtat catctggcag ccacctcgg agaagggggg 60
 gatccactag ttctagagcg gccgcaccgc ggtggagctc agctttt
 <210> 88
 <211> 109
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 88
 ccatgtggaa gcacagctat aaggctcttt ctatgaacca gaaagcaggc tttctctaaa 60
 caccgaatct gccaatgcct tgatcttggga tttccagat tccgaacta
 <210> 89
 <211> 112
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 89
 cagggactta atcaacgcaa gcttatgacc cgcacttact gggaattcct cgttcatggg 60
 gaataattgc aatccccgat ccccatcacg aatgggggtc aacgggttac cc
 <210> 90
 <211> 125
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 90
 acctgtaatc ccaactactc tggaggctga ggcaggagaa tggcatgaac ccgggaggtg 60
 gaggatgcag tgagccaaga ttgtgccact gaactctagc ccaggcaaaag gtgagagact 120
 tgatc
 <210> 91
 <211> 130
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 91
 cacttaagat tgtatctttn actctatgag ttattttctca ataaaaagta aaatnannn 60
 tactaataat taganatnat cttctctaga atgagcattn aatgagtcag ctagagaggc 120

15/24

gacttaactg

<210> 92

<211> 104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 92

cagcccttac attgtgtctg tgacccagtg ttaaagaga cccaggtcaa gagacaactc 60
 ttgggctggt ctaggatatt ntataanaa gatctatcac tctg

<210> 93

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 93

cgtcagctca gcagcctgac aatttgaact cagtagtata acattgccac atggctatgt 60
 tcaggggtta atacttctta gcaagaaaat agagaccaat ctctgtgata actttaaact 120
 tt

<210> 94

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 94

cacatggatg gggaggcctt ccaatcatgg cagaaggcaa aggagaaagn nagcacatct 60
 tacaggcagc aggcaa

<210> 95

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 95

cagccccagc atggcaggaa tatntntngc attgggttct ttggaggagg aaagtacgtn 60
 qtcagagnag gcaattntc gccgctggtt taaggctttn natgaccga

<210> 96

<211> 112

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 96

cagccccgaa ttatgtatta anagttatcc tcaccaagaa agacaagggt tctgtagttc 60
 tctaactaca tatccctata tanntntnac tgtgcagtat ccagacaatg acactccttc 120
 agagagaatt ctatggccac atctctaa

<210> 97

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 97

taaaactttg ttataagaga tggaagggtt taaatatata nntctaannn ntntagttt 60
 aaagaattcc aaacttaaac atcttcagta gacttgacat tgtatttcgn atatcctatg 120
 tc

<210> 98

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 98

ttttaaattt ataaactcca aggcagtaca agtctggnnn nnnnnnagct acccaatata 60
 tgataaatat gaatacctaa taatagac

16/24

<210> 99
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 99
 tcctaaaact ctccctcacc agcatcccaa tttaaagcct tggtccttgc tcctccctct 60
 aggggggatcc actagttcta gagcggccgc caccgcggtg gagct
 <210> 100
 <211> 86
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 100
 cgccactatg ctcagctact tnnnntntgt ttgtagaga tgggtgtttc accatgttgc 60
 ccagactgat cttanactcc tgggtc
 <210> 101
 <211> 156
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 101
 gaccctccac tgatttncca tcttgaccac tgcctaccca attactgtnc cagtcgaaac 60
 ctgggcgcca tgtgacgact ctctccctct ctacagctac acaaccgcgc tgtgctgtgc 120
 ggtcttatcc ttccaccca gtccatggtt tgggtc
 <210> 102
 <211> 173
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 102
 cagccccata aaattaacca tcacactagg tgatgtcttt nttttttgag agcaagtctt 60
 gctcgtcacc aggctggaat actgtggttg gatctcagct cactgcacct ccacctcctg 120
 gggtccagca attgttctgc ctcagcctgg gggatccact agttctagag cgg
 <210> 103
 <211> 191
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 103
 cagccccctt agaaatagct cttcgagaca ctctggtag acatgatccc aggcttgctg 60
 agcagctgtg caaccatgcc tcaggcctga ggaacagctc gcaggccact ctgtctggta 120
 ataccccagg ccggccaagc aatagatctg catcccaggg ggatccacta gttctagagc 180
 ggccgccacc g
 <210> 104
 <211> 191
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 104
 bagccccctt ggctcagtct ggaaaggcaa gacaactaga aggtgggggg cttccagggc 60
 ataggtagat tcanaaatgt actgattggc acttccttga ccgagttatt aactaaagac 120
 ctggaatcaa tagaaaggaa tgtctgggtt aaggtaaggg ctatggggga tccactagtt 180
 ctgacggcc g
 <210> 105
 <211> 103
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 105
 ttctnagana tttnacatca nattaaccca ctganaaaact tgcaactct cactttcaac 60
 gtctgancgg naattttaat tggnggatcc actagttcta gag

17/24

<210> 106
<211> 173
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 106
cagccccctt aattaactcac cccttgcatt tgttcaacc tagntaataa agtcactcag 60
gtgtacttct ganaattgaa gttaaatttt tttcaccaca gagctgaacc attacagag 120
<210> 107
<211> 111
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 107
tcataanata accattaata tnnnnntnnn nnnnnnatcc taacattttt ctaacacata 60
aacatattca ctggggaggc cgaggcgggc ggatcacgag gtcaggagat c
<210> 108
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 108
caatttacac tctggcaggg ggaganagga naatttntnc tgtnggaagg gggagttgng 60
gnaggaggcc
<210> 109
<211> 104
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 109
caaanactaa natacctctn agtctggnta gacactttca ctggataggt agaggccttt 60
nctacaggnt atnanaaggc caccacagtc atttnttccc ttct
<210> 110
<211> 68
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 110
tcattgtaggc ctnttcaaga ttttnnaaat catttnagtn acatccaagt nnnntngct
gttaatca
<210> 111
<211> 107
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 111
cagccccaat caagggtgtt ttctcaattc ctttgtataa aannctagat tctgtattag 60
tctgtttctca ggctgctaataa aaagacatac ccaaggctgc gtacttt
<210> 112
<211> 173
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 112
tggaagaaa aactatgtac atctgagacg ctgcagctgg tctctactt ctttcagagc 60
atcaacaggt taagtgtgga ttcattcaca cctcagacc cgtgaccgta g
<210> 113
<211> 121
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 113
gaatctctac accaaccctc tcttaacctc tacagttcaa atccaaatct caaactttct 60

18/24

gatttgaatt tgcttatccc tatgtaattc taacttaaga cctaagacca aaaggggaatc 120
c

<210> 114

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 114

tcttccagct aaatagittgc agagtcagag tagaagccag ctctcctgac aatatatttn
atgatattct agagaatattc cctagaatca ttcttaggta etc

<210> 115

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 115

tgtcattggg aatttatgtg agaacacaaa gcatccaaca ntanngtatt ctgcatttcg 60
accaacagat agttttctcat cgaaga

<210> 116

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 116

cagccccgtt tgttttacct ttngcttttn atgtgcttct ctaacanttn agggcgaaact 60
aaccagcatg aggnntgtnt ctgcttgatt ttnaaccatc ctttcctgtc tgtacacagg 120

<210> 117

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 117

cctccctga gtctntntaa cagcagcact gcccccaaac ctnanttggt tcccctgata 60
gccagggtacc cggnttctnt ngcagtgcta actgt

<210> 118

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 118

tattaannnn nctaactctna atattntngt ntctcgggga acagaaaagc ctgaggagaa 60
ggagagatag tnggaatntc tagttnttgg agcagtcaga acacacata

<210> 119

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 119

cctgtatttac agaaccaagg attaaaaaact cagcagatgt gtaatgagtt ttaaataatt 60
acaatatnnn nnntataaa

<210> 120

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 120

tagttgatcc gnnagcccat gcgataccgc gnnngcgctc gnnngccgang ggggatccac 60
tagttctaga gcggccgcca ccg

<210> 121

<211> 177

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

19/24

<400> 121

cgtttgtttt accttttcaact tttaatgtgc tttctctaac 'aattaagggc gaactaacca 60
 gcatgaggat tgtgtctgct tgatttttaa ccatacctta atgtctgtac acaggaaatg 120
 ttatcaacaa gagatgattc ttgggggatc cactagggtc tagagcggcc gccaccg

<210> 122

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 122

ttatagttta anacanagat ggtaacagcc ctttcccaaa gcagacctcc ttcttgccctg 60
 gnaaaagggt gttaccatct ttgtttttaa ctataaacta taa

<210> 123

<211> 139

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 123

caagaagggt ggtgctggca tttncctctg gtgagggcct caggaagctt tcaatcatgg 60
 cagaaagtga gaggagagta ggcattgtcac anagagagac atgccttcat tctcggggga 120
 tccactagtt cttagcg

<210> 124

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 124

cattaaagcc tttnttagga aatctnttta aacaacagaa taaaagggt gactttnaga 60
 tagaactttn ngtgacatct ccagtttctg gttacatgat att

<210> 125

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 125

cagagagaga gaaacanaca gncagagaga gagagaccac anagagagag agagagagaa 60
 gatcagacag agaaaganag agacagagac agacannnag aca

<210> 126

<211> 113

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 126

cagccccaga gagagagaaa cagacaggna gagagagaga gacacagaga gagagagaga 60
 gagaagatca gacagagaaa gagagagaca gagacagaca nanagaatag aga

<210> 127

<211> 181

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 127

actcatttta tgaggccaga atcatcctga taccaaaacc tggcagagac acacacacac 60
 aaaagaaaat ttcaggcaa tatccctgat aaacattgat gcaaaaatcc tcaataaaat 120
 actggcaaac tgaatccagt agcacatcaa aaagctgggg gatccactag ttctagagcg 180
 g

<210> 128

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 128

20/24

cccgcccat gtagctctca ggtggcccat gacaccacac tgttcttctt tctctccat 60
 gggtcacacc ggccacctag tcagtcctaa cgctcgaacc tggatacctc cattgctggt 120
 gctggacccg tcaactgtttt ggatattttc

<210> 129

<211> 173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 129

tcctaagtgt cccaacagtg gagcacatta ttcaggaact taaagatata atcgcagaac 60
 agcacctcca agctcgtaaa tgcttatctc ggtaaccctc agtcatggga caatcaaatt 120
 caatacatcg gaggaacacc atgctgacgg gggatccact agttctagag cgg

<210> 130

<211> 187

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 130

ctatagaagc tccttctata ttngccttat nncactcatg gcggtagtft gaattcagat 60
 ctctgggtca tttattatcc atggaaagtt aatttgagat gttggaactt ttaaacagt 120
 tttgtttatt gtgctaataca cgatctgtta ctaaatttga ttgggggatc cactagttct 180
 agagcgg

<210> 131

<211> 170

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 131

cagatatttg tagatatgcc gcgttatttc tgagggtctt gttctgttcc attgatctat 60
 atctctgtct ttggtaccag taccatgctg ttttggttac tgtagccttg tagtatagtt 120
 tgaagtcagg tagcatgatg cctccggggg atccactagt tctagagcgg

<210> 132

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 132

tctctaaaat tctatggtag ttgaaaggct acacaaaagt ttttggacct gatacaaata 60
 ttataaatnn nnnnnnnnt gtntgatttg atactccatg taaaactctt cctaattggtc 120
 tcgggggatc cactagttct agagcgg

<210> 133

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 133

tattaaaaat acaaaaaatt agccgggagt ggtggcacgc gcctgtagtc ccagctactc 60
 gggaggctat ggcaggaaaa tcccttgaac ctgggaggcg gaagttgcag cgagaagaga 120
 tca

<210> 134

<211> 164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 134

ctgtctttca agtttcaggc ttgaaagtga aaaataatgc ataatttacg gaagctattg 60
 gtgtgaaaaat atccaagaga agaatgagga atagtggagt gaaataaaca ggagattagg 120
 tagatagaaa ttgactattg ggggatccac tagttctaga gcgg

<210> 135

21/24

<211> 193

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 135

cttaatatgg tatgcttaat gtagtgagct aaacaaaata acaatgtgta tagtattgtg 60
 taanataccc cacttccaat tgttttaaagt gcaaaacaaa ttatatgttt ganagttaag 120
 gtggaataaaa tgaagattaa atgatatgaa ctactcagaa aacaggtagg gggatccact 180
 agttctagag cgg

<210> 136

<211> 233

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 136

cattgattaa atttattgat gcattgtaaa tttgaatcaa tatctattaa tcccaagctg 60
 gagtgcagtg gcgccatctc agctcactgc gacctctgcc tcccgggttc aagcaattct 120
 catacctcag cctcccagtg agctggaacc acaggcatga gccaccatgc cgggctagtt 180
 acagggtttt cctatgctat ccaggctgga gtgcagtggtt ggatccacta gtt

<210> 137

<211> 194

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 137

ctaaaggatc cttcaactct gtgagttgaa tacacacaac acaaggaagt tactgagaat 60
 tattctgtct agcataatat gaagaaatcc cgtttccaac tgaagacctc aaagaggctg 120
 aatatccact tgcagacttt acagagtgtt tcctaactgc tctatgagag ggggatccac 180
 tagttctaga gcgg

<210> 138

<211> 155

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 138

cagccccgaa aatatacggc aaattttttt attttgctgt ttggtgactc caccactttt 60
 gcaacagtac ttttggtgcc cattaaccaa attactttga tttctttgtg taaatattat 120
 gaagaccaga accttttgag ggggatccac tagtt

<210> 139

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 139

ctagacaaaa gccccatcac ctggatgaat cagtgcagag ttacgtcaca aagtcctttt 60
 aggcagatcc tagacaaggg ttacatcact tggatgatca gtgcagagat atgtcacaat 120
 gccactgtag ggtgagccta gaaaagagtt tcatgaccta ggtgatcagt gcagaggggg 180
 atccactagt tctagagcgg

<210> 140

<211> 169

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 140

ctgtgactgt gcctatagaa gaaaaaaaaa atagcgtgta atctcagcac tctgggaggg 60
 caaagcaggg gggatcactt gaggccaaga gttcaagacc agcctggcca acaaagcgaa 120
 accttctctc tactaaaaat acaaaaatta gccgggcatg gtggcactc

<210> 141

<211> 211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

22/24

<400> 141

agggccacca gctgggtgaat cctgccccac cagctcagag ctcttcccat tcatggagta 60
 tatcatagga gactggattt ccaaagctgc atggagcttc attcctgaac tggtcaccct 120
 gtgtctagtc ttgttttctc aatccatcct gctctccagc agcctcaata cttctaaaat 180
 tgtccggggg atccactagt tctagaggcg g

<210> 142

<211> 195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 142

cacagacatc ctgtgccacc tcattcactc tcacatgcct ctgagggtgag ggggataaca 60
 gcactagtat catttgatac tgatacaaat cggctctaaa tattgtgggg atgctgggtg 120
 tggtattgct ggactccatt acacaagttt catgagccag tgaaaatcac tgtgggggat 180
 ccactagttc tagag

<210> 143

<211> 199

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 143

Cagccctaaa gtataataaa aaaaaatttt ttaaagaatc ttcacaaaag aactctgaaa 60
 tgtcagcatg agcagatgat gaagtatcat aggaatccat tttttgctgt atttcttatt 120
 taatagagaa agaaatttca tatgctgtaa tatgtttcca attggaaatt aaaatctgat 180
 aggggggatc cactagttc

<210> 144

<211> 178

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 144

cagccccctt gtaacaatat gggtgtttct agctgtaatt cacctctgga gccatcagaa 60
 tcctcctggt aaaaatggcc ctaatatcaa acacagaggc cactgctagt taaactttat 120
 aaatcgaaca agaaatcata tgatataatc agataagagc ctgggggatc cactagtt

<210> 145

<211> 158

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 145

cagccccctg ggtcaagca atctgccac ctcggcctcc ccaagtgctg ggattacagg 60
 tgtgagtnac tgncccggc cagccttgc tatttgtcag aaacagggag ttgggggaac 120
 cctggtgcca agatatgggg gggatccact agttctag

<210> 146

<211> 184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 146

cagcccctgc taaataactt tcgaagttaa gaaagctaatt ggtatatcat caggcaccaa 60
 taaaactatc ttgagatttg acaatgcaa ctgaaaaatt tcttctgcaa ggcagagcca 120
 gttacctttt ataatatcaa tttagattca cacaaagaca ttctcagggg gatccactag 180
 ttct

<210> 147

<211> 219

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 147

cagccccacg ggtggtaatc ntggctgctt tntgcacttc cacataaagt gcttctncta 60
 cgctgtctcc actcagaaac aattacaaca gtatgtgaag cagtattgaa aacttcnnaa 120

23/24

gctgcacaca gattcattga aaagggcaga agcctcatta atactagagt ctgaggcaca 180
 acctatgacc gaacactggg ggggatccac tagttctag ,

<210> 148

<211> 185

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 148

cagccccag aaaaaaaga gcaagaggat ggggctgaaa aaattactca aagaaataa 60
 ggctaaaaag tactcaggtt tatcaaaaga caagtctgca gaactaagaa gatgacaaaa 120
 tccttgcat agacagaatg tgtgtttccc aaacttcgtg tgttgggggg atccactagt 180
 tctag

<210> 149

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 149

cagccctgca gtatttagtt ttctattcct gagttagttc acttaggaaa atgggtctcta 60
 gctccatcca tgaagcacca aatccctcca gcccagtagc aaggagacag aatttttact 120
 ctgtctctg

<210> 150

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 150

cagcccctct tttctgctcc taaggaagat gcattctcag gatacaggan nnnngggggga 60
 tccactagtt catg

<210> 151

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 151

cagccccatt taacctggag aggaataccc taaggattct tggaggctga aagacttaaa 60
 atttgaggaa tgaaagaata gcaagggtga atcgg

<210> 152

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 152

cagccctgca gtatttagtt ttctattcct gagttagttc acttaggaaa atgggtctcta 60
 gctccatcca tgaagcacca aatccctcca gcccagtagc aaggagacag aatttttact 120
 ctgtctctga tgagaagagt gtac

<210> 153

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 153

cagccctgat agttacctta ctgttttgct atgaccatac tctacataga gtatttagat 60
 taaatggagg aatgagaata tgagattagt ttctcatatt cttgtgatca tgacaggacc 120
 tgagattctg cacagatg

<210> 154

<211> 139

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

24/24

<400> 154

cagccccgct gtttctaaag tcagtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgagag 60
agagagagag agagagagcg tatgcatgtg tgtctgcatg tgtgtgtgcg cgcgtacatt 120
tgggagacgg tgtgtaagt

<210> 155

<211> 133

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 155

cagcccgga aggtaataca agtaagatga ttataaaca atgctttaaa acagagtcaa 60
tgaaaccagt ctgttttga ggcccaaggc tccatatttt acaactcagt ctgtaaggat 120
agctatgtat ctg

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.